

DNA 표지인자에 의한 스트레스 감수성 (PSS)
돼지 검색 기술 개발

Development of detection techniques for PSS
pig by DNA marker

서울대학교 농업생명과학대학

농림부

최 종 보 고 서

1994년도 농림수산특정연구사업에 의하여 완료된 "DNA 표지인자에 의한 스트레스 감수성 (PSS) 돼지 검색 기술 개발"에 관한 연구의 최종 보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

- 첨 부 : 1. 최종 보고서 8부
2. 최종보고서 디스켓 1매.

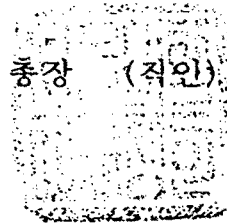
1997년 11월 19일

주관 연구 기관 : 서울대학교 농업생명과학대학

총괄연구책임자 : 박 영 일



주관연구기관장 : 서울대학교 총장 (직인)



농림부장관 귀하

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 "DNA 표지인자에 의한 스트레스 감수성 (PSS) 돼지, 검색기술 개발" 과제의 최종 보고서로 제출합니다.

1997년 11월 19일

주관연구기관명 : 서울대학교 농업생명과학대학

총괄연구책임자 : 박 영 일

연 구 원 : 한 재 용

연 구 원 : 이 학 교

협동연구기관명 : 덴브레드 코리아

협동연구책임자 : 배 규 한

요 약 문

I. 제 목

DNA 표지인자에 의한 스트레스 감수성(PSS) 돼지 검색기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

돼지는 품종 또는 개체에 따라 스트레스에 영향을 받는 스트레스 감수성에 차이가 있으며 특히 스트레스에 민감한 돼지를 스트레스 증후군(porcine stress syndrome, PSS)돼지라고 한다. 스트레스 감수성 돼지는 암돼지의 경우 산자수가 정상 개체 보다 떨어지고(10~20% 감소) 비육돈의 경우 발육이 저하되며 약간의 스트레스(온도 및 과밀 사육 등)요인이 제공될 경우 폐사하게 된다. 즉 이러한 유전인자를 보유한 개체 중 12%이상이 육성중 폐사를 일으키며 생존한 개체 중 50%이상이 PSE(Pale, Soft and Exudative) 돈육을 생산하게 되며 육질 저하로 인한 가공성 및 식육상의 결함 등으로 국내에서도 막대한 경제적 손실이 추정되고 있다. 따라서 이들 불량 유전형질을 집단 내에서 제거시켜야 할 당위성이 존재하고 있다.

본 연구는 불량 유전 형질을 신속하고 정확하게 검색하는 기법을 개발하고 이를 통해 국내 축군의 PSS 유전자 존재 빈도 및 분포 양상을 파악하여 불량 유전자의 효율적 제거 및 능력 향상 기술을 개발하고자 수행하였다. 본 연구에서는 시험용 축군으로 경북에 Y 종돈장과 경기도의 D 종돈장 등 전국 23개소의 상업용 종돈장에서 보유하고 있는 여러 품종을 대상으로 연구를 수행하였다.

PSS 유전인자는 육량 증진과 연관되어 있다는 보고가 있으며, 실제로 유럽에서는 이들 유전자가 고정된 부계와 이 유전자가 전혀 없는 모계통을 교배시킴으로써 실용돈에서 잠재성 유전자를 가지는 개체를 생산해서 이 유전자의 유리한 작용을 육종계획에 이용하고 있다. 따라서 불량 유전형질의 제거를 위한 신속 정확한 유전자 검색 기법을 개발함과 동시에 이 유전자가 경제형질에 미치는 영향에 대한 연구가 이루어져야 하겠다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는

- ① 유전자형 판별기술 확립,
- ② 판별기술 향상,
- ③ 판별기술의 정확도 검증을 거친 후,
- ④ 유전양상 확인과 열성 유전자형이 성장에 미치는 효과 파악,
- ⑤ 국내 집단 내에서의 열성 대립형질의 빈도 파악과 유전자형에 따른 경제형질 측정,
- ⑥ 그리고 형질에 대한 유전자형 효과를 분석하였으며, 결론적으로 PSS 유전자와 관련된 중돈 육종기법에 대한 방향성을 제시하고자 하였다.

우선, 능력검정중인 자돈의 혈액, 정액, 조직 등을 이용하여 적절한 DNA 분리 방법을 확립하였으며, 효율적인 DNA 증폭조건을 설정하기 위해 여러 가지의 PCR primer를 합성하였다. 선별된 PCR primer를 이용하여 증폭된 산물을 제한효소로 단편화 한 후 열성 돌연변이의 존재 여부를 확인하였는데, 1차 처리한 효소에 의한 단편화 여부와 상반되는 결과를 보이는 2차 제한효

소 처리를 통해 유전자형 판별에 오차를 제거하였다.

유전자형 판별기법이 확립된 이후에 판별기법의 효율과 용이성을 높이기 위해, 제한효소 처리과정을 생략하여 유전자형을 판별할 수 있는 기법인 유전자형 특이 증폭방법(AS-PCR, allele specific PCR)을 도입하였고, DNA 분리과정을 생략할 수 있는 혈액 직접 증폭법(blood direct PCR)을 확립하였을 뿐만 아니라, 채혈이나 조직시료 채취과정을 간편화하기 위해 모근을 이용한 유전자형 판별을 시도하였다.

이러한 과정을 통해 유전자형 판별기술을 향상하고 난 다음으로, 열성 유전자변이에 의한 스트레스 감수성 여부를 확인하기 위해 halothane 가스를 이용한 발작 여부를 검사하여 유전자형과의 관계를 관찰하였다. 또한, 열성유전자를 가지는 개체들을 교배하여 얻어지는 서로 다른 유전자형의 자손들 간의 성장시의 특성을 비교하였다.

이러한 확립된 기술을 이용하여 국내 능력검정집단에 대해 PSS 유전자형을 판별하였으며, 능력검정에서 측정된 자료를 바탕으로 유전자형의 효과를 분석하였다. 얻어진 결론을 이용하여 PSS유전자를 종돈육종에 활용할 수 있는 방법에 대하여 고찰하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발의 결과

본 실험에 사용된 공시축은 전국 4개 도(경기도, 경상도, 전라도, 제주도)의 23개 종돈장으로부터 종돈 능력 검정을 위해 출품된 종돈과 서울대학교 부속목장 및 다비 육종의 돼지로 구성되었으며, 능력검정을 위해서는 총 1,463두의 공시축이 사용되었다. 종돈장으로부터의 샘플은 이표 작업시 발생되는 귀 조직을 채취하였으며 서울대학교 부속목장에서 사육된 돼지의 혈액을 확보하여 DNA 추출용 샘플을 수집하였다. 탐색키트 개발은 GenBank에 제시된 염기서열을 바탕으로 PSS 인자 탐색을 할 수 있는 primer를 제작하여 분석에 이용하였다. 채취한 귀 조직으로부터 DNA 추출은 GNOME™ DNA isolation Kit.(BIO 101 Inc., USA)를 이용하여 protocol에 따라 genomic DNA를 추출하였다. 또한 돼지의 경정맥으로부터 채취된 혈액을 이용하여 buffy coat를 모으고 이를 Proteinase K와 페놀을 처리하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 적량후 50~100ng/ μ l 정도의 농도로 유지하여 보관하였다.

사용된 PCR용 primer는 Fujii 등(1991)에 의해 보고된 primer sequence와 본 연구에 의해 확립된 Primer를 이용하였다. 각각 83bp와 479bp 크기의 증폭산물을 얻을 수 있었으며 제한효소 처리후 유전자형을 정확히 측정할 수 있었다. 증폭된 PCR산물은 두 가지의 제한효소를 이용하여 실험상의 오차를 제거하였다. Hha I에 의해 정상 개체는 단편화되어 51, 32bp크기를 보였고 돌연변이 유전자형은 단편화되지 않았다. 또한 479bp 크기의 산물은 294bp와 185bp크기의 단편을 나타냈다. 따라서 확립된 PCR증폭조건과 제한효소 처리조건, 전기영동 기법에 의해 정확한 유전자형

을 검색할 수 있었다.

확립된 판별기법의 효율과 용이성을 높이기 위해, 제한효소 처리과정을 생략하여 유전자형을 판별할 수 있는 기법인 유전자형 특이 증폭방법(AS-PCR, allele specific PCR)을 도입하였고, DNA 분리과정을 생략할 수 있는 혈액 직접 증폭법(blood direct PCR)을 확립하였을 뿐만 아니라, 채혈이나 조직시료 채취과정을 간편화하기 위해 모근을 이용한 유전자형 판별을 시도하였다.

PCR증폭을 위해 혈액을 직접 이용하고자 혈액을 1000배 이상 희석하여 이를 전처리 과정을 거쳐 이용하였다. 여러 효소저해제의 효과를 최소화 할 수 있을 뿐 아니라, 염과 항응고제에 의한 효과를 피하기 위해 백혈구세포가 4-40개가 포함된 희석된 혈액을 이용하였고, 동결, 용해의 과정을 1-2회 실시한 후, 97℃, 3분, 55℃, 3분의 과정을 3회 반복하여 세포파괴를 완료하여 PCR반응에 이용하였다.

다수의 가축을 대상으로 유전자형을 검색하기 위해 매우 유용한 유전자 재료로써 이용될 수 있는 모근을 이용하기 위해 모근을 증류수와 알코올로 각각 2회 세척한 다음 100개 내외의 모근을 직접 전자렌지에서 3-10분간 처리하여 모근내의 세포의 파괴를 일으켰다. 처리된 모근은 3 mL의 증류수로 씻어내어 세포파괴시 추출된 DNA를 녹여 내고 이를 5-10ul 이용하여 PCR을 실시하였다. 연구 결과 모근을 이용한 직접 PCR기법이 가능함을 제시하였고 추가적인 연구에 의해 안정된 기술로 확립되었다.

또한 보다 신속하고 간편한 검색방법인 AS-PCR(allele specific PCR)기법을 도입하여 검색 가능성을 타진하였다. 이용된 PCR primer는 각각의 유전자형에 특이적인 서열로 구성되었으며, 정상, 헤테로, PSS 개체에서 모두 공통적으로 479bp 크기의 밴드가 나타났다. 추가적으로 정상개체에서는 208bp, PSS 개체는 316bp 밴드가 보였으며 헤테로 개체에서는 정상 개체와 PSS 개체에서 나타나는 모든 밴드를 보였다. 따라서 AS-PCR 기법을 통

해 PCR 증폭만으로도 유전자형 판별이 가능하였고 따라서 제한효소를 처리 과정을 생략할 수 있었다.

유전자형 판별기술이 향상된 이후에는, 열성 유전자변이에 의한 스트레스 감수성 여부를 확인하기 위해 halothane 가스를 이용한 발작 여부를 검사하여 PSS 유전자형과의 관계를 관찰하였다. 또한, 열성유전자를 가지는 개체들을 교배하여 얻어지는 서로 다른 유전자형의 자손들 간의 성장시의 특성을 비교하였다. PSS 잠재성 개체(피에트레인과 대요크셔의 교잡종)끼리의 두 번의 교배를 통하여 총 27두의 산자를 얻었다. 각각의 산자의 PSS 유전자형을 파악하였고, 자돈 21두를 대상으로 생후 10주령시 halothane 가스 검사를 실시하였다. 예상되었던 바와 마찬가지로 halothane 검사시 양성을 보인 개체는 DNA 검사에서도 열성의 유전자를 동형 접합체로 가지는 것으로 나타나 halothane 가스 검사에 의해 양성을 보이는 개체는 돌연변이 열성 유전자를 호모상태로 가진다는 것을 확인할 수 있었다.

DNA검사에 의해 확인된 ryr 1 유전자의 돌연변이 양상은 halothane 가스 검사에 의한 열성개체의 검색과 마찬가지로 안정적인 유전 전이 양상을 확인하기 위해 조성된 두 가계를 이용하여 유전자형을 조사하였다.

유전자형이 잠재성(N/n)인 개체간의 교배에 의한 후대에서의 분리비를 보면 정상개체는 27두 중 8두로 나타났으며 PSS 열성 개체는 전체 5두로써 가계 1에서 3두, 가계 2에서 2두로 나타났다. 후대에서의 이같은 분리비는 멘델법칙에 의하여 기대되는 분리비, $\frac{1}{4}NN : \frac{1}{2}Nn : \frac{1}{4}nn$ 에 비하여 유의성 있는 차이가 없었다. 또한 PSS 유전자를 homo 상태로 갖는 PSS 개체는 5두중 3두가 생후 2주내에 폐사하여 PSS 개체는 사육환경에 적응하는 것이 어려운 것으로 판단되었다.

PSS 유전자의 효과를 추정하기 위하여, 국내 능력검정집단에 대해 유전자형을 판별하였으며, 경제형질에 대한 능력을 바탕으로 유전자형의 효과를

분석하였다. 종돈장 및 다른 관계기관으로부터 채취한 조직으로부터 PCR-RFLP에 의해 유전자형이 판별된 개체는 전체 총 1,463두(95년 : 175두, 96년 : 695두, 97년 : 502두)로 유전자형 빈도는 정상개체(N/N) 1,183(80.86%)두, 잠재성 개체(N/n) 254(17.36%)두 그리고 PSS 개체(n/n) 26(1.78%)두로 나타났다.

품종별 PSS 유전자의 비율을 Houde 등(1993)이 보고한 것과 비교해 보면, 듀록(헤테로 3.0%, PSS 0%)과 대요크셔(헤테로 16.8%, PSS 1.3%)는 PSS 유전자의 비율이 외국과 차이가 거의 없음을 보여준다. 그러나 랜드레이스의 경우에는 헤테로 27.3%, PSS 1.9%에 비해 34.9%, 4.9%로 매우 높은 비율을 나타나고 있음을 알 수 있다. 이렇게 품종별 PSS 유전자 비율이 듀록에서 가장 낮으며, 랜드레이스가 가장 높게 나타나는 양상은 외국의 경우와 일치하는 것을 알 수 있으나 랜드레이스의 경우에는 외국에 비해 다소간 높은 비율을 보이고 있다.

출품된 종돈의 PSS 출현빈도가 종돈장별로 상당한 변이가 존재하고 있었다. 그러나 종돈장별 출품 두수가 일정하지 않아 종돈장별 PSS 유전자 보유 여부를 정확하게 추측하기는 어렵지만 23개 분석 대상 종돈장중 5개 종돈장만이 출품된 종돈 모두가 PSS 감수성 유전자를 보유되지 않은 것으로 나타났으며 특히 9개 종돈장은 출품 종돈의 20%이상이 PSS 유전자를 호모 또는 헤테로 상태로 보유하고 있는 것으로 나타났다. 어느 종돈장의 경우에는 PSS 유전자가 높은 다른 종돈장으로부터 종돈을 분양 받아 높은 비율의 PSS 유전자가 존재하는 것으로 생각된다. 이와 같이 현재 외국으로부터 도입되어지고 있는 종돈은 PSS 유전자에 대한 검색이 없이 외국의 종돈을 무분별하게 도입함으로써 불량 유전자의 확산을 초래하게 된 것으로 생각된다. 따라서 앞으로 외국 종돈의 수입시 PSS 유전자 등 불량 유전자의 검색을 반드시 해야할 것으로 생각된다. 또한 종돈장별로 이들 PSS 유전자 보유현황을 정확하게 GGPS나 GPS에서 분석을 함으로써 집단내로부터 이러한 열성 PSS 유전자를 제거하는 육종 프로그램의 도입이 시급한 실정임을 본 연구 결과 알 수 있었다.

4개 도별에 대한 지역 분포를 보면 타 지역(전라도, 제주도, 경기도)은 일정한 PSS 유전자 비율로 큰 차이를 보이지 않았으나 경상도 지역에서는 헤테로 28.7%, PSS 6.0%로 매우 높은 비율의 PSS 유전자 비율을 보였다.

따라서 외국에 비해 우리나라에서 PSS 유전자의 빈도가 다소 높은 것은 전국적으로 PSS 유전자가 고르게 분포되어 있기보다는 일부 지역의 종돈장에서 상대적으로 높은 비율의 PSS 유전자가 나타남으로써 전체적으로 높게 나타났다.

정상, 잠재성 또는 PSS로 판별된 돼지 1,463두에 대한 능력검정에서 측정된 일당증체량, 90kg도달일령, 사료요구율, 등지방두께, 정육율 및 선발지수에 관한 자료는 최소자승법을 이용하여 통계분석을 실시하였다. 이 능력검정에서 측정된 각 형질에 대한 분산분석결과 중 유의성 검정결과를 보면 PSS에 대한 유전자형간 차이는 일당증체량, 90kg 도달일령 및 30kg 도달일령에 대하여 통계적 유의성이 있었으나 사료요구율, 등지방두께, 정육율 및 선발지수에 대하여는 통계적 유의성이 없었다. 또한 PSS 유전자와 경제형질간의 상관관계는 정상, 잠재성 및 PSS 돼지의 능력검정자료의 통계분석결과에 근거하여 추정하였다.

검정기간중의 일당증체량과 PSS 유전자와의 관계에 있어서는 PSS 개체의 평균 일당증체량은 797.9g으로 세 유전자형 중 가장 낮았으며 잠재성 개체에서는 871.81g, 그리고 정상개체에서는 876.8g으로 가장 높게 추정되었다. 90kg 도달일령에 있어서는 PSS 개체에서 152.0일로 가장 늦었으며 다음은 잠재성 개체의 144.6일 그리고 정상개체에서는 142.7일의 순으로 추정되었다. 사료요구율에 있어서는 PSS 개체에서 2.44로 가장 불량하였고 잠재성 개체와 정상개체에서는 각각 2.38 및 2.39이었다. 등지방두께는 PSS 개체에서와 잠재성 개체에서 모두 1.45cm이고, 그리고 정상개체에서 1.47cm로 추정되어 세 유전자형간 차이가 작은 경향이 있었다. 정육율에 있어서는 PSS 개체에서 56.4%로 세 유전자형 중 가장 높았고 다음은 잠재성 개체의 56.3%와 정상개체의

56.1%의 순이었다. 선발지수는 PSS 개체에서 202.2로 가장 낮았고 정상개체와 잠재성 개체에서는 210.2로 추정되었다.

돼지의 생존율에 영향을 미치는 몇 가지 질병과 신체 이상의 유전자형별 발생빈도를 보면 조사대상돈 695두 중에서 패혈증의 발생률이 PSS 돼지에서 다른 두 유전자형에 비하여 높았으며 전지이상, 후지이상, 위축돈 및 생식기 이상의 발생률은 잠재성 개체에서 정상개체에 비하여 높은 경향이 있었다.

이상의 통계분석 결과로 미루어 볼 때 PSS 유전자를 Homo 상태로 가지고 있는 PSS 개체는 일당증체량이 현저하게 낮고 90kg 도달일령이 늦어지는 등 경제적 손실을 초래하므로 효과적인 육종 프로그램을 통하여 PSS 유전자를 제거하는 것이 필요한 것으로 추론된다.

2. 활용 및 건의

PCR-RFLP 기법에 의한 DNA 검색 기술은 정확하고 신속하며 잠재성 개체의 구분도 가능하다는 이점이 있기 때문에 이러한 기법을 이용하여 집단내 증식돈을 생산할 수 있는 핵군에 대하여 PSS 유전자를 검색할 경우 1~2세대만에 집단내에서 이러한 불량형질을 완전하게 제거할 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 이러한 DNA 검색 기술에 의한 PSS 유전자의 검색 방법은 분자생물학적 기술과 제반 기기가 필요하기 때문에 대규모 종돈장의 경우에도 쉽게 접근할 수 없는 현실을 감안할 때 종돈 산업의 경쟁력 제고 측면에서 대학이나 국가연구기관 등과의 산·학·연 협동이 보다 적극적으로 수행되어 종돈의 생산 및 현장의 애로를 효율적으로 해결하는 것이 바람직하다고 생각된다.

따라서 종돈 능력 검정소에서 검정하는 종돈에 대해 일차적으로 PSS 인자 보유 여부를 검색하여 열성 유전자를 호모상태로 가진 PSS 돼지가 농가에 보급되는 경로를 차단하고, 국내 종돈장과 연계하여 PSS 인자 보유 종돈을 검색하여 육종 프로그램에 이용하며 농가에 PSS 인자 보유 돼지를 더 이

상 보급되지 않도록 체계화 해야할 것이다. 개발 후에는 국내 축산 관련 연구 기관과 연계하여 본 기술의 간편화 및 실용화를 확립하는 것이 중요할 것으로 사료된다.

SUMMARY

To increase the productivity of swine and the income from pig farming in Korea, it is important to remove the PSS (Porcine Stress Syndrome) gene from Korean pig population. Therefore, this research was conducted to develop the screening methods for PSS gene and the breeding system which will adopt the PSS screening method.

Experimental animals were secured from the pig farms located in many parts of Korea. Genomic DNA was extracted from blood, semen and tissues of pig. The primers used for PSS screening were synthesized using DNA sequence deposited in GenBank. Two sets of them were optimized to screen the PSS gene and were used for the population screening. The optimal condition for restriction digestion and electrophoresis was also established. The optimal condition of primer for amplification was as follows : The optimum amount of primer was 10pmole and genomic DNA for PCR amplification was from 100ng to 200ng. The gel electrophoresis in agarose gel or 15% polyacrylamide gel were suitable for the genotyping of PSS. PCR for 479bp and 83bp fragments including point-mutated 1843 nucleotide(C→T) in ryanodine receptor 1 gene was performed and then, PCR products were digested by restriction enzyme, Hha I(G↓CGC) and Asp H I. As a result of PCR-RFLP, normal homozygous type(N/N) showed two fragments, normal heterozygous type(N/n) had two digested and one undigested fragments, and PSS homozygous type(n/n) had

only one undigested fragment.

After the establishment of screening techniques, the effort was continued to enhance the methods for technical relief. First, blood direct PCR methods was performed using diluted several white blood cells, resulting successful amplification. Next, direct PCR amplification using the hair-root cell from 100 pulled out hairs or so. Hair root cell was broken by microwave oven for 3-5 minutes. Also successful, stable amplification was obtained using treated hair-root cells. Finally, allele specific PCR was carried out for labour saving in genetic screening. Using one set of outer sequences and two oligonucleotides for each specific allele, genotype differentiating amplification pattern was obtained.

Based on the above screening condition, the genotype of 1,463 individuals were determined. The frequency of PSS gene based on the test was 0.098 in L. Yorkshires, 0.224 in Landraces and 0.015 in Durocs. The frequency of PSS gene estimated in this study was similar to the estimates of other countries in L. Yorkshires and Durocs, but was higher in Landraces. The frequency of PSS gene estimated was higher in Kyungsang-do than in 3 other provinces. Variation among the breeding farms in the frequency of PSS gene was also observed in this study. Of 23 farms studied, the frequency of PSS gene was zero only in 5 farms. In view of the overall frequency, 0.105 of PSS gene estimated in this study, it appears that the PSS genes were not eliminated systematically in Korea.

A total of 27 progenies were produced from the carrier(Nn) × carrier(Nn) matings with the cross between Pietrain and Large Yorkshire at the Experimental Farm of Seoul National University.

The segregation ratio in the progenies from the mating was 8 normal(NN):14 heterozygote(Nn):5 PSS(nn), which was not significantly different from the segregation ratio expected on the basis of the autosomal inheritance of the PSS gene. The viability to 2 weeks of age estimated in the progenies produced at the SNU Experimental Farm was 100% for normal, 78.6% for the heterozygote and 40% for the PSS pigs.

The normal and heterozygote pigs genotyped by PCR-RFLP showed the negative reaction to the halothane test and the PSS pigs genotyped by PCR-RFLP showed the positive reaction to the halothane test which indicates the complete agreement between the results of PCR-RFLP and halothane test.

The effect of the PSS genotype on the economic traits was estimated on the basis of the data obtained from the performance test of 1,463 pigs that were genotyped with respect to PSS. The nn pigs(PSS) reached at 30kg at significantly older age than the NN pig(Normal) by 4.2 days. The age at 90kg was significantly older in the nn pigs than in the NN pigs by 9.3 days. Average daily gain was significantly lower in the nn pigs than in the NN pigs by 78.9g. The difference between the two homozygotes(NN-nn) in backfat thickness estimated was 0.055cm in males and -0.068cm in females, indicating the significant interaction between PSS genotype and sex for backfat thickness. The difference between NN and nn pigs estimated was -0.03% for lean meat percent and 7.6 for selection index. The difference between the heterozygote and the mean of the two homozygotes, $Nn-(NN+nn)/2$, estimated was -0.7 day for the age at 30kg.

-2.75 days for the age at 90kg, 34.45g for average daily gain, -0.035 for feed efficiency, 0.0165cm for backfat thickness in males, -0.057cm in backfat thickness in females, 0.05% for the lean meat content and 4.2 for selection index.

In view of the results obtained in this study, it was recommended to establish the breeding system which can effectively eliminate the PSS gene from the nucleus herds or from other breeding stocks in Korea by means of the genotyping of the breeding stock with respect to PSS using the PCR-RFLP technique developed in this study and by selecting against the PSS pigs and the carriers of the PSS gene.

CONTENTS

I . Introduction	20
1. Objectives and scope	20
2. Goals of research	23
1) Final goals of research	23
2) Scope of research	24
II . Materials and Methods	29
1. Experimental animals and sample preparation	29
2. Development of technique for genotyping	29
1) DNA extraction	29
2) Preparation of PCR primer and PCR amplification	32
3. Enhancement of genotyping techniques	33
1) Blood direct PCR	33
2) Hair root direct PCR	34
3) AS-PCR	34
4. Confirmation of the test accuracy	35
1) PCR genotyping	35
2) Halothane test	36
5. Genotyping, performance test and application of PSS gene	36
1) Genotyping	36
2) Performance test of genotyped animal	36
3) Statistical analysis	37
4) Application of PSS gene in swine breeding	37

III. Results and Discussion	38
1. Experimental animals	38
2. Development of technique for genotyping	38
1) DNA extraction	38
2) Preparation of PCR primer and PCR amplification	42
3) R. E. treatment and electrophoresis	44
3. Enhancement of genotyping techniques	48
1) Blood direct PCR	48
2) Hair root direct PCR	49
3) AS-PCR	51
4. Confirmation of the test accuracy	55
1) PCR genotyping and test of the accuracy	55
2) Inheritance of PSS gene	56
5. Frequency of PSS genotypes	60
6. Effect of PSS genotypes on economic traits	64
1) Performance test and the effect of PSS genotypes	64
2) Statistical analysis	68
7. Application of PSS gene in swine breeding	77
1) PSS gene in swine breeding	77
2) Methods for preventing the loss due to PSS gene	78
8. Conclusions	80
9. Literature Cited	81
IV. Expected Accomplishment and Its Application	84
1. Expected accomplishment	84
2. Application of the expected accomplishment	85

목 차

제 1 장. 서 론	20
제 1. 절 연구개발의 목적과 범위	20
제 2. 절 연구개발사업 목표	23
1. 최종연구 사업개발 목표	23
2. 연구범위	24
제 2 장. 실험내용 및 방법	29
제 1 절. 시험축 선정, 구입 및 시료 채취	29
제 2 절. 유전자형 판별 기술 확립	29
1. DNA 추출	29
2. PCR primer의 작성 및 PCR 증폭조건 확립	32
제 3 절. 유전자형 판별 기술의 효율 향상	33
1. 혈액 직접 PCR기법 확립	33
2. 모근을 이용한 PCR 기법 확립	34
3. AS-PCR 기법을 이용한 유전자형 판별 기술 확립	34
제 4 절. 유전자형 파악의 정확도 검증	35
1. PCR을 이용한 유전자형 파악	35
2. Halothane 검사	36
제 5 절. 유전자형 파악, 능력검정 및 PSS 유전자의 응용	36
1. 유전자형 파악	36
2. 유전자형확인 종돈의 능력 검정	36
3. 조사자료의 통계분석	37
4. 종돈개량에 있어 PSS 유전자의 응용	37

제 3 장. 연구개발 결과	38
제 1 절. 시험축군의 확보	38
제 2 절. 유전자형 판별기술 확립	38
1. Genomic DNA추출	38
2. Primer 준비 및 PCR 증폭조건 확립	42
3. 제한효소 처리 및 전기영동조건 확립	42
제 3 절. 유전자형 판별기술의 효율 향상	48
1. 혈액 직접 PCR기법 확립	48
2. 모근을 이용한 PCR기법 확립	49
3. AS-PCR 기법을 이용한 유전자형 판별 기술 확립	51
제 4 절. 유전자형 파악의 정확도 검증과 유전자형의 유전양상 확인	55
1. 유전자형 파악 및 정확도 검증	55
2. PSS 유전자의 유전양상 파악	56
제 5 절. PSS 유전자형의 빈도	60
제 6 절. PSS 유전자형이 경제형질에 미치는 효과	64
1. 능력검정과 PSS 유전자형의 효과	64
2. 통계분석	68
제 7 절. 종돈육종에 있어 PSS 유전자의 응용	77
1. 종돈 개량 측면에서의 PSS 유전자	77
2. PSS 유전자에 의한 피해를 예방하기 위한 방법	78
제 8 절. 결론	80
제 9 절. 참고문헌	81
제 4 장. 기대되는 성과 및 활용성	84
제 1 절. 기대되는 성과	84
제 2 절. 활용 및 건의	85

제 1 장. 서 론

제 1 절. 연구개발의 목적과 범위

최근의 종돈개량사업은 정육의 생산량을 증가시키는 방향으로 실시되어 왔다. 이러한 종돈개량사업의 결과로 생산되는 도체의 지방함량은 감소되고 정육의 생산량은 증가하게 되었다(Aalhus 등, 1991). 그러나 육생산이 증가한 반면 소음이나, 고온, 운송 등의 환경자극에 매우 민감하여 이로 인해 체내대사가 원만하게 진행되지 않는 이상 현상을 보이는 빈도가 증가하였다. 이러한 이상 현상은 halothane 검사에 의해 조사할 수 있게 되었고 halothane 가스 검사에 의한 종돈개량이 진행되어 왔다(Jones et. al., 1972).

돼지는 품종간뿐만 아니라, 품종내에서도 개체에 따라 스트레스에 영향을 받는 스트레스 감수성에 차이가 있으며 특히 스트레스에 민감한 돼지를 스트레스 증후군(porcine stress syndrome, PSS)돼지라고 한다. 스트레스 감수성 돼지는 암돼지의 경우 산자수가 정상 개체보다 떨어지고(10-20% 감소) 비육돈의 경우 발육이 저하되며 약간의 스트레스(온도 및 밀사 등)요인이 제공될 경우 폐사하게 된다(Webb 등, 1982).

즉 이러한 PSS는 주로 열성유전인자에 의해 좌우되는 것으로 알려져 있는데 이러한 유전인자를 보유한 개체중 12%이상이 육성중 폐사를 일으키며 생존한 개체중 50%이상이 PSE(Pale, Soft and Exudative) 돈육을 생산하게 되며(Webb과 Simpson, 1986). 이러한 육질 저하로 인한 가공성 및 식육상의 결함 등으로 국내에서 막대한 경제적 손실이 추정되고 있어, 이들 불량 유전형질을 집단내에서 제거시켜야 할 당위성이 존재하고 있다.

우리나라의 경우 1980년 PSE 돈육 발생 조사보고서에서 27.3%가 PSE 돈육이라고 보고되었고 1988년 축산시험장보고서에서도 20%가 PSE 돈육으로 판명되었으며 이러한 PSE 돈육 발생으로 인한 대일 수출 돈육의 반송 비율이 상당히 높은 것으로 알려져 있다. 외국의 경우 전체 집단중 약 18% 이상(미국 15.5%, 캐나다 18.8%, 영국 29.4%)의 개체들이 잠재성 유전자를 가지고 있으며(O'Brien 등, 1993), 따라서 국내집단에 대하여 유전자형을 검색하는 것은 고급육생산을 통한 수출형 양돈산업 육성이라는 국가적 축산시책에 중요한 기여를 할 수 있을 것으로 생각된다.

그러나 PSS 유전 인자가 미치는 이러한 국내외적 심각성에 비해 이 유전 인자(PSS)를 가진 돼지의 제거노력 및 연구는 상당히 미흡하여 그 결과를 찾기 어렵다.

94년 여름 무더위에 의한 고온 스트레스에 의해 전국적으로 전체 모돈 50만두 중 4천두 이상의 모돈이 폐사됨에 따라 엄청난 피해가 속출되었다. 이러한 시점에서 신속 정확한 분자 생물학적 첨단 기법을 이용한 스트레스 감수성 돼지의 조기 검색으로 육종계획을 수립하고 이 기술의 실용화를 확립하여 각 종돈장의 돼지를 대상으로 이들 PSS 유전자 보유여부를 검사할 수 있는 기술 지원체계를 정착시키는 것이 매우 절박하며, 양돈산업의 국제경쟁력을 갖추기 위한 방안으로 매우 절실한 육종기술이라 하겠다.

현재 PSS 인자 검색 방법으로는 할로텐 가스로 마취하여 근육의 강직 여부로써 판정하고 있으나, 여러 마리의 종돈을 대상으로 할로텐 가스로 마취해야 하는 기술운용상의 불편성, 잠재성 개체를 파악하지 못하는 부정확성 및 돼지에 미치는 부작용 등으로 인하여 실제 민간 농장(종돈장 포함)에서는 거의 사용되고 있지 않기 때문에 이들 불량 유전자 검색과 이를 응용한 육종계획은 전무한 실정이다. 그러나 외국의 경우 1992년부터 돼지의 혈액으로부터 DNA를 검사하여 정확히 PSS 감수성 유전인자 보유여부를 판정하는 기술을 개발하여 불량 유전인자를 제거시켜 스트레스에 의한 돼지 폐사율을 급감시키고 또한 도살 후 발생하는 열등육(PSE)생산을 억제하는 등 자국의 양돈산

업의 경쟁력을 극대화시키는 획기적인 기술진보가 이루어지고 있다(O'Brien 등, 1993; Fujii 등, 1991; Rempel 등, 1993; Pommier와 Houde, 1993).

한편 이들 PSS 유전인자가 육량증가와 연관이 되어있다고 보고되었으며, 실제로 유럽에서는 이들 유전자가 고정된 부계와 이 유전자가 전혀 없는 모계통을 교배시켜 실용돈에서는 잠재성 유전자를 가지는 개체를 생산해서 이 유전자의 유리한 작용을 육종계획에 이용하고 있다. 따라서 국내 양돈산업의 육류 수입에 대한 경쟁력 제고 차원에서 양돈산업의 오랜 숙원인 불량 유전형질의 제거를 위한 신속 정확한 유전자 검색 기법을 개발함과 동시에 이 유전자와 연관된 유리한 경제형질을 이용할 수 있는 방향으로 하루 빨리 연구가 이루어져야 하겠다.

본 연구는 유전자형 판별기술 확립, 판별기술 향상, 판별기술의 정확도 검증 등을 거친 후, 유전양상 확인과 열성 유전자형이 성장에 미치는 효과 파악, 국내 집단 내에서의 열성 대립형질의 빈도 파악과 유전자형에 따른 경제형질 측정, 그리고 형질에 대한 유전자형 효과를 분석하였으며, 결론적으로 PSS 유전자와 관련된 육종기법에 대한 방향성을 제시하고자 하였다.

우선, 능력검정중인 자돈의 혈액, 정액, 조직 등을 이용하여 적절한 DNA 분리 방법을 확립하였으며, 효율적인 DNA 증폭조건을 설정하기 위해 여러 가지의 PCR primer를 합성하였다. 선별된 PCR primer를 이용하여 증폭된 산물을 제한효소로 단편화 한 후 열성 돌연변이의 존재 여부를 확인하였는데, 1차 처리한 효소에 의한 단편화 여부와 상반되는 결과를 보이는 2차 제한효소 처리를 통해 유전자형 판별에 오차를 제거하였다.

유전자형 판별기법이 확립된 이후에 판별기법의 효율과 용이성을 높이기 위해, 제한효소 처리과정을 생략하여 유전자형을 판별할 수 있는 기법인 유전자형 특이 증폭방법(AS-PCR, allele specific PCR)을 도입하였고, DNA 분리과정을 생략할 수 있는 혈액 직접 증폭법(blood direct PCR)을 확립하였을 뿐만 아니라, 채혈이나 조직시료 채취과정을 간편화하기 위해 모근을 이

용한 유전자형 판별을 시도하였다.

이러한 과정을 통해 유전자형 판별기술을 향상시킨 다음, 열성 유전자변이에 의한 스트레스 감수성 여부를 확인하기 위해 halothane 가스를 이용한 발작 여부를 검사하여 유전자형과의 관계를 관찰하였다. 또한, 열성유전자를 가지는 개체들을 교배하여 얻어지는 서로 다른 유전자형의 자손들 간의 성장시의 특성을 비교하였다.

이러한 확립된 기술을 이용하여 국내 능력검정집단에 대해 유전자형을 판별하였으며, 경제형질에 대한 능력을 바탕으로 유전자형의 효과를 분석하였다. 얻어진 결론을 이용하여 PSS유전자를 종돈육종에 응용할 수 있는 방법에 대하여 고찰하였다.

제 2 절 연구개발사업목표

1. 최종연구 사업개발 목표

가. 스트레스 감수성(PSS) 돼지 검색 기술 개발

돼지 개체별 혈액, 정액, 조직으로부터 손쉽게 DNA를 추출하며, PCR 증폭과정을 효율화하며, 제한효소 처리와 전기영동 조건을 확립하여 DNA를 이용한 스트레스 감수성 유전자형(저항성, 잠재성, 감수성) 판별기법을 확립한다. 또한 전통적인 검색방법과 DNA감식기법에 의한 결과 및 정확도를 비교하고 교배하여 생산된 자손을 검정하여 실제 이들 유전 인자의 유전양상과 유전자형에 따른 영향을 파악한다.

나. 국내 종돈의 PSS 인자의 검색 및 영향 규명

우리나라 종돈장에서 사육중인 종돈의 개체별 스트레스 감수성 유전인자 보유여부를 대규모로 검색하며, 유전자형이 확인된 개체들에 대한 능력검정을 실시하고 검정결과를 이용하여 유전자형에 따른 경제형질에 미치는 효과를 분석하여 알아본다.

다. PSS인자에 대한 육종 응용기술 개발

실제 농가에서 사육중인 모돈 및 비육돈의 스트레스 감수성 유전인자 보유 여부의 확인과 PSS 유전인자를 가진 개체들이 정육율이 높아 실제 비육돈 생산에 유리한 효과를 나타낼 수 있으므로 PSS 유전인자를 일부 가지면서 이 유전인자의 나쁜 영향을 극소화시키고, 비육돈의 정육율을 높여 경제성을 향상시키는 PSS 유전인자의 육종 응용기술에 대하여 고찰한다.

2. 연구 범위

가. 스트레스 감수성 검색기술 개발

1) 농가(종돈)로부터 시료 준비

농가(종돈장)로부터 돼지의 혈액, 정액, 모근 시료를 확보함으로써 PSS 유전자의 판별을 위한 시험축을 선정한다.

2) DNA 추출 및 PCR에 의한 증폭

채취한 시료로부터 고농도, 고순도의 DNA를 추출하여, 이를 PCR에 의해 증폭함으로써 유전자형을 판별하기 위한 PCR 증폭산물을 얻는다.

3) PSS 유전자형 판별

PCR에 의해 증폭된 산물을 제한 효소로 처리하여 폴리아크릴아마이드 젤에 전기영동함으로써 개체의 유전자형을 판별할 수 있게 한다.

나. 검색기술의 효율 향상

1) AS-PCR기법 확립

유전자형에 따라 증폭되는 산물의 크기가 다른 PCR primer를 합성하여 증폭조건을 확립하며 제한효소 처리과정이 필요 없는 유전자형 판별기술을 확립한다.

2) 혈액 직접 증폭법 확립

채혈된 혈액의 미량을 전처리를 통해 세포를 파괴하고 이를 직접 증폭반응에 이용하여 DNA를 분리하는 과정을 거치지 않고 유전자형을 판별할 수 있는 기술을 확립한다.

3) 모근을 이용한 증폭법 확립

채혈이나 조직 시료 채취의 과정을 보다 간편하게 하기 위해, 모근을 이용하여 증폭반응을 실시할 수 있는 기술을 확립한다.

다. 유전자형파악의 정확도 검증과 유전자형의 유전양상 확인

1) 파악된 유전자형과 halothane 검색결과의 일치여부 확인

DNA 검사를 통해 확인된 유전자형과 halothane 검사에 의한 결과를 비교

하여 DNA검사에 의해 스트레스 감수성 개체 확인 가능여부에 대한 정확도를 검증한다.

2) 성장시 유전자형에 따른 스트레스 감수성 파악과 유전양상 확인

DNA검사를 통해 확인된 잠재성 개체들간의 교배를 통해 여러 유전자형의 자손을 생산하고, 생산된 자손의 유전자형과 성장과정의 특성을 확인하여 유전자형의 유전양상을 파악하며, 각 유전자형에 따른 성장시의 효과를 확인한다.

라. 종돈 및 비육돈의 스트레스 감수성 유전자형 판별

1) 혈액 및 조직 확보

유전자형 판별을 위한 샘플 확보를 위하여 경정맥으로부터 혈액을 채취하였으며 조직은 귀를 채취하였다.

2) DNA 추출 및 PCR 증폭

PCR을 위한 DNA는 genomic DNA isolation kit와 페놀 추출법을 이용하여 고농도의 DNA를 추출하였으며, 확립된 조건에 의해 PCR 증폭을 실시하였다.

3) 제한 효소 처리 및 전기 영동

PCR-RFLP를 위한 PCR 산물에 대한 제한 효소 처리 조건을 확보하였고 이를 최적의 전기 영동 조건으로 개체에 대한 유전자형을 판별하였다.

마. PSS 유전자형별 능력검정

스트레스 감수성, 잠재성, 저항성 돼지로 판별된 개체들에 대한 능력자료를 분석함으로써, PSS 유전자와 경제형질간의 상호 관계를 파악하고, 그 효과를 추정한다.

1) 유전자형 확인 자돈의 능력 검정

- 자돈의 생존율, 성장률, 증체량 측정

PCR-RFLP에 의해 유전자형이 판별된 자돈에 대한 생존율, 성장률, 증체량을 측정함으로써 PSS 유전자의 경제 형질과의 상관 관계 규명을 위한 기본 자료를 확보하였다. 이는 PSS 유전자의 경제 형질과의 유의성을 판단할 수 있는 기초 자료를 마련하였다.

- 자돈의 등지방 두께 및 정육율 측정

PCR-RFLP에 의해 유전자형이 판별된 자돈에 대한 등지방 두께, 정육율을 측정함으로써 PSS 유전자가 경제 형질에 미치는 영향을 규명하기 위한 기본 자료를 확보하였다.

2) 조사자료의 통계분석

- 정상, 잠재성, PSS 돼지의 능력 자료 분석에 의한 PSS 유전자와 경제형질간 상관 관계 규명

PSS 유전자와 경제형질간의 상관 관계를 규명하고자 정상, 잠재성, PSS 돼지의 능력 자료를 통계적으로 분석하여 경제형질에 미치는 효과를 분석하였다.

- 육종프로그램에 활용 체계 확립

통계분석에 의한 자료를 근거로 하여 국내 육종 프로그램에서의 활용 방안을 확립하고자 하였다.

제 2 장. 실험내용 및 방법

제 1 절. 시험축 선정, 구입 및 시료 채취

국내 돼지(종돈포함) 사육 농장에서 5품종(랜드레이스, 대요크셔, 듀록, 햄프셔, 버크셔)과 교잡종 돼지 총 1,463두에 대해 혈액 또는 정액이나 자돈의 이표 표식시 얻어진 일부 귀 조직 또는 꼬리의 일부를 미량 절단하여 채취하였다. 혈액과 정액 및 조직은 DNA 추출에 이용되었으며, 혈액은 직접 PCR 증폭법에도 사용되었다. 또한 서울대학교 부속목장에서 사육되는 일부 돼지의 모근을 이용하여 PCR 증폭법에 이용하였다.

스트레스 감수성 유전자형 파악의 정확도 검증과 유전자형의 유전양상을 확인하기 위해 PSS 잠재성인 피에트레인과 대요크셔종의 교잡종을 이용하여 2가계를 조성하여 이용하였으며 유전자형 검사를 위해 생산된 자돈의 혈액을 채취하여 이용하였다.

제 2 절. 유전자형 판별 기술 확립

1. DNA 추출

가. 조직(귀, 꼬리)으로부터의 DNA 추출

- 1) 채취한 조직(귀, 꼬리)을 칼로 잘게 자른다.

- 2) 잘게 자른 조직을 300 μ l lysis buffer(50 mM Tris, 100mM EDTA, 100mM NaCl, 1% SDS)가 담긴 1.5ml 튜브에 담는다.
- 3) 10mg/ml 농도의 proteinase K를 35 μ l씩 첨가한다.
- 4) 55 $^{\circ}$ C shaking water bath에서 15~18시간 흔들어 주면서 조직을 용해시킨다.
- 5) 샘플을 꺼내고, 20 μ l의 RNase(10mg/ μ l)를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 1~2시간 incubation시킨다.
- 6) 동량의 페놀을 첨가하고 잘 흔들어 준 후에 5~10 분간 원심분리하여 층을 분리한다.
- 7) 새로운 튜브에 상등액을 조심스럽게 옮겨 놓는다.
- 8) 위의 페놀 처리 과정을 두 번 반복한다.
- 9) 동량의 페놀:클로로포름(1:1)을 처리하여 잘 흔들어 준 후에 14,000rpm으로 7분간 원심분리한다.
- 10) 상등액을 조심스럽게 다른 튜브에 옮겨 놓는다
- 11) 페놀:클로로포름 추출을 두 차례 반복한다
- 12) 클로로포름을 처리한 후 상등액을 새로운 튜브로 옮긴다.
- 13) 100% 에탄올을 가하여 DNA를 침전시키고 14,000rpm에서 15분간 원심분리하여 DNA를 모았다.
- 14) 에탄올을 제거하고 70% 에탄올로 염을 제거한 다음 건조시켰다. 건조가 끝난 다음 TE (pH 8.0) 또는 증류수에 DNA를 녹이고 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

나. 혈액으로부터 DNA 추출

돼지의 경정맥으로부터 혈액 10ml을 채혈한 다음, 3000rpm에서 15분간 원심 분리하여 buffy coat를 모으고 이를 1.5ml tube로 옮기고, 1X SSC

로 buffy coat를 부유시킨 다음 8000rpm에서 10분간 원심 분리하여 pellet을 모았다. 이 과정을 2회 반복한 다음 원심 분리하여 모아진 pellet을 Lysis buffer로 재부유시키고, proteinase K(20mg/ml)를 처리하여 65°C에서 6시간 이상 incubation 하였다. 동량의 phenol로 1회, phenol : chloroform (1 : 1)으로 2회, 그리고 chloroform : isoamylalcohol (24 : 1)로 1회 추출하고 상층액을 셀룰로스 튜브에 넣어 24시간 dialysis시켰다. 추출한 DNA는 최종적으로 50~100ng/ μ l 정도의 농도로 유지하여 보관하였다.

다. 정액으로부터의 DNA추출

- 1) 정액의 양을 측정한다.
- 2) 정액을 100mM EDTA, 100mM Tris-HCl(pH 8.0)에 부유 시킨 후 원심분리(5,000/10min, 0°C)하여 세척한다.
- 3) 정액의 원래 양과 같은 양으로 부유시키고 정액 부유액 1ml을 20ml [2%(v/v) 2-mecarpoethanol, 10mM Tris-Cl, 0.15M NaCl, 10mM EDTA, 0.5% SDS]에 재 부유 시킨다.
- 4) 50°C water bath에서 30분간 배양시킨다.
- 5) Proteinase K(20mg/ml)를 최종농도가 300 μ g/ml 되도록 첨가하고 50°C에서 3시간 동안 더 배양한다.
- 6) Phenol(saturated)로 5~6회 DNA를 추출한다.
- 7) 남아 있는 phenol을 제거하기 위해 Chloroform으로 1회 처리한다.
- 8) 1 l의 0.5mM EDTA에 DNA 용액을 투석한다.
- 9) DNA용액에 1/10 vol.의 3M sodium acetate(pH 5.0)를 가한다.
- 10) 잘 섞은 다음 0.6 vol.의 isoprophanol을 가한 다음 잘 섞는다. 그리고 10분간 -20°C에 보관하였다가 원심분리(10,000rpm/20min)하여 DNA를 침

전시킨다. 후에 건조시킨 다음 TE(pH 8.0)에 녹여 보관한다.

2. PCR primer의 작성 및 PCR 증폭조건 확립

탐색 키트를 제작하기 위해 PSS 인자와 관련 있는 칼슘통로 단백질 (Ca^{2+} channel)을 만드는 유전자의 1843번째 DNA 염기서열의 돌연변이 부위를 증폭하여 확인하기 위해 목적에 맞게 적절한 다수의 primer를 제작하였고, 이들 primer를 이용하여 축군의 유전자형을 판별하였다.

본 실험에 사용된 primer는 Fujii 등(1991)에 의해 보고된 primer sequence (RYR#1, 5'-GTTCC CTGTG TGTGT GCAAT GGTG-3' RYR#2, 5'-ATCTC TAGAG CCAGG GAGCA AGTTC TCAGT AAT-3') 와 본 연구에 의해 개발된 EX F와(5'-ACC ACC TCT TCT CAG TCA CAT CCC-3'), EX R을(5'-GAG ACA GAG GGA GAA AGA GTT TG-3')을 이용하였다. 각각은 증폭산물의 크기가 83bp와 479bp였으며 제한효소 처리에 의해 유전자형 판별에 이용되었다.

PCR은 DNA Thermocycler(Perkin-Elmer Cetus, USA)를 사용하였으며, PCR 반응액은 genomic DNA 50~100ng, 200uM dNTP, 10X reaction buffer(100mM Tris-Cl pH 8.3, 500mM KCl, 15mM $MgCl_2$), 각각의 20pmol의 primer, Taq DNA polymerase 2units를 첨가하여 총 50 μ l로 하였다. PCR cycle은 pre-denaturation step으로 94 $^{\circ}C$ 에서 3분을 한 후에 denaturation 94 $^{\circ}C$ 1분, annealing은 각각의 primer 쌍에 따라 68 $^{\circ}C$ 1분(RYR#1,RYR#2)과 63 $^{\circ}C$ 1분(EX F, EX R)으로 하였으며, extension 72 $^{\circ}C$ 30초로 하여 총 40회를 반복한 후 72 $^{\circ}C$ 에서 5분으로 PCR 반응을 종료하였다.

3. 제한효소 처리 및 전기영동

PCR 증폭산물은 돌연변이 부위를 인지할 수 있는 제한 효소인 Hha I 및 Asp H I 으로 증폭산물을 절단하였고 아가로즈와 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동을 실시하여 최적의 전기 영동 조건을 설정하였다.

제 3 절. 유전자형 판별기술의 효율향상

1. 혈액 직접 PCR기법 확립

혈액으로부터 DNA를 추출하지 않고 혈액으로부터 직접 PCR을 하는 방법으로 유전자형을 판별하고자 하였다. 채취된 혈액을 흔들어 섞은 후 백혈구 세포가 골고루 존재하는 혈액 1 μ l를 ddH₂O 1ml에 넣고 가볍게 섞는다. 따라서 저장액 효과에 의해 혈구가 파괴되며, 이를 다시 -70 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 방치하여 동결시킨 후, 상온에서 용해하여 세포핵의 파괴과정을 촉진하였다. 준비된 시료를 PCR 반응에 이용하기 전에, 5-10 μ l를 새로운 튜브에 넣은 후 50 μ l 미네럴오일러 덮은 후 PCR기기를 이용하여 97 $^{\circ}$ C 3분, 55 $^{\circ}$ C 3분을 3회 유지하여 혈구세포의 파괴를 종결하였고 PCR 반응이 필요한 반응 시약을 추가로 첨가하였다. 준비된 반응액을 선정된 PCR 조건에 의해 증폭하였다.

2. 모근을 이용한 PCR 기법 확립

모근으로부터의 PCR은 샘플(모근) 채취에 있어 매우 용이할 뿐만 아니라 빠른 시간에 유전자형을 판별할 수 있는 방법으로 스트레스 감수성(PSS) 돼지의 검색 기술에 적합하고 유용한 방법이라 할 수 있다. 100개 내외의 모근을 채취한 뒤, 95% 에탄올을 이용하여 2회 세척한 후 증류수를 1-2ml 넣은 후 전자레인지에서 3분간 가열하여 모근세포를 파괴하였다. 준비된 처리액은 세포파괴가 종결되어 DNA의 일부가 용액내에 존재하므로 이를 PCR 반응에 이용하였다. DNA 용액을 1, 2, 5, 10, 20 μ l를 50 μ l의 PCR 반응용액에 이용하여 증폭양상을 관찰하였으며 적정 PCR 증폭양상이 확인되는 조건을 이후 실험에 이용하였다.

3. AS-PCR기법을 이용한 유전자형 판별 기술 확립

가. PCR primer 작성

본 실험에서는 보다 신속하고 간편한 검색방법인 AS-PCR(allele specific PCR)기법을 도입하여 검색 가능성을 타진하였다. 유전자형 특이 PCR(AS-PCR)기법은 정상과 돌연변이를 보이는 유전자형 각각에 대하여 특이적인 올리고뉴클레오타이드를 PCR반응의 primer로 사용하여 각각의 유전자형에 따라 다른 크기의 증폭산물을 얻을 수 있으므로 유전자형 파악이 단 1회의 PCR반응만으로 가능한 방법이다. 이를 위하여 돌연변이를 보이는 부위를 포함하는 바깥쪽의 primer 1쌍(EX F, EX R)과 각각의 유전자형 특이 primer를 제작하였다(INF F, INF R). 사용된 primer sequence는 다음과 같았다.
(1) RYR EX F, 24 mer 5'-ACC ACC TCT TCT CAG TCA CAT

CCC-3', (2) RYR EX R, 23 mer 5'-GAG ACA GAG GGA GAA AGA GTT TG-3', (3) RYR INT F, 22 mer 5'-GTG TGC AAT GGT GTG GCC GCG T-3', (4) RYR INT R, 24 mer 5'-AGT AAT GAG ATC TTG GTT GGA TCG-3'.

나. Primer별 증폭조건 확립

PCR 방법은 총 reaction량이 50 μ l 되도록 PCR 혼합액을 섞은 다음 PCR cycle은 pre-denaturation step으로 94 $^{\circ}$ C에서 5분을 한 후에 denaturation 94 $^{\circ}$ C 1분, annealing 63 $^{\circ}$ C 1분, extension 72 $^{\circ}$ C 1분으로 하여 총 35회를 반복한 후 72 $^{\circ}$ C에서 5분으로 PCR 반응을 종료하였다.

제 4 절. 유전자형 파악의 정확도 검증

1. PCR을 이용한 유전자형 파악

PCR에 의해 증폭된 산물에 제한 효소(Hha I)를 처리한 후 15% 폴리아크릴아마이드 겔에 2시간동안 전기영동으로 나타나는 밴드 양상에 의해 유전자형을 판별하였다. 즉 정상인 개체는 두 개의 밴드(32bp, 51bp), PSS인 개체는 하나의 밴드(83bp), 잠재성인 개체는 세 개의 밴드(32bp, 51bp, 83bp)를 나타내어 각 개체에 대한 유전자형을 판별하였다.

2. Halothane 검사

DNA 테스트에 의하여 유전자형이 판명된 개체에 대하여 코에 할로텐 가스(산소 97%, 할로텐 가스 3%)를 3분 동안 마취시킨 뒤 근육의 강직현상을 관찰한다. 사지의 강직현상이 나타나는 개체는 스트레스 감수성 개체이며, 사지의 강직현상이 없는 개체는 정상인 개체로 판정하였다.

제 5 절. 유전자형파악, 능력검정 및 PSS 유전자의 응용

1. 유전자형 파악

국내 종돈장 및 기관으로부터 채취한 조직과 혈액을 이용하여 유전자형 검색을 실시하였다. 검색방법은 앞서 확립된 PCR 증폭방법과 제한효소 처리에 의한 방법을 이용하였으며, AS-PCR기법에 의해서도 성공적으로 유전자형 판별을 실시할 수 있었다.

2. 유전자형 확인 종돈의 능력 검정

가. 종돈의 생존율, 성장률, 증체량 측정

PCR-RFLP에 의해 유전자형이 판별된 자돈에 대한 생존율, 성장률, 증체량을 측정함으로써 PSS 유전자의 경제 형질과의 상관 관계 규명을 위한 기본 자료를 확보하였다. 이는 PSS 유전자의 경제 형질과의 유의성을 판단할 수 있는 기초 자료를 마련하였다.

나. 종돈의 등지방 두께 및 정육을 측정

PCR-RFLP에 의해 유전자형이 판별된 자돈에 대한 등지방 두께, 정육을 측정함으로써 PSS 유전자가 도체 형질에 미치는 영향을 규명하기 위한 기본 자료를 확보하였다. 따라서 자료 분석을 통하여 PSS 유전자가 경제형질에 미치는 효과에 관한 기본 자료를 마련하였다.

3. 조사자료의 통계분석

가. 정상, 잠재성, PSS 돼지의 능력 자료 분석에 의한 PSS 유전자의 경제형질과 상관 관계 규명

PSS 유전자의 경제형질과의 상관 관계를 규명하고자 정상, 잠재성, PSS 돼지의 능력 자료를 통계적으로 경제형질에 대한 유의성 여부를 분석하였다. 따라서 많은 수의 샘플에 대한 능력 자료를 확보하여 통계 분석을 통해 수행하였다.

나. 통계분석에 의한 육종프로그램에 활용 체계 확립

통계분석에 의한 자료를 근거로 하여 국내 육종 프로그램에서의 활용 방안을 확립하고자 하였다.

4. 종돈개량에 있어 PSS 유전자의 응용

PCR-RFLP 기법에 의하여 PSS 유전자형이 판별된 돼지에 대한 능력검정에서 조사된 자료 등에 근거하여 종돈개량을 위한 PSS 유전자의 응용과 PSS 유전자에 의한 피해를 줄이기 위한 방법에 대한 연구를 수행하였다.

제 3 장 . 연구개발결과

제 1 절 . 시험 축군의 확보

본 실험의 1차년도에 사용된 공시축은 PSS 인자 검색 키트를 제작하기 위한 시험용 축군으로 경북에 Y 종돈장과 경기도의 D 종돈장 등 상업용 종돈회사와 서울대학교 부속목장에서 보유하고 있는 랜드레이스, 대요크셔, 듀록, 삼원교잡종(YLD)의 혈액이나 정액 또는 조직 175두 분을 확보하여 이용하였다. 또한 2차년도에는 전국 4개 도(경기도, 경상도, 전라도, 제주도) 23개 종돈장으로부터 종돈 능력 검정을 위해 출품된 종돈 총 695두(대요크셔 383두, 랜드레이스 173두, 듀록 139두)의 공시축으로 사용하였으며, 3차년도에는 총 593개체에 대해 검정개시전 자체 번호 부여를 위해 수행하고 있는 이표 작업시 발생하는 귀 조직을 채취하여 DNA 추출용 샘플을 수집하였다.

또한 본 연구를 위하여 서울대학교 농업생명과학대학 부속 실험목장에서 PSS 유전자를 hetero 상태로 가지고 있는 개체(Pietrain종과 대요크셔종간 일대잡종)간의 교배를 통해서 27두의 자돈을 생산하여 실험 축군으로 활용하였다.

제 2 절 . 유전자형 판별기술 확립

1. Genomic DNA 추출

가. 조직으로부터 DNA 추출

채취한 귀 조직으로부터 DNA 추출은 GNOME™ DNA isolation Kit (BIO 101 Inc., USA)를 이용하여 protocol에 따라 genomic DNA를 추출하였다. 추출한 DNA는 최종적으로 에탄올 침전을 한 후 50~100ng/ μ l 정도의 농도로 하여 TE buffer(10mM Tris · Cl pH7.4, 1mM EDTA)에 녹여 보관하였다(figure 1).

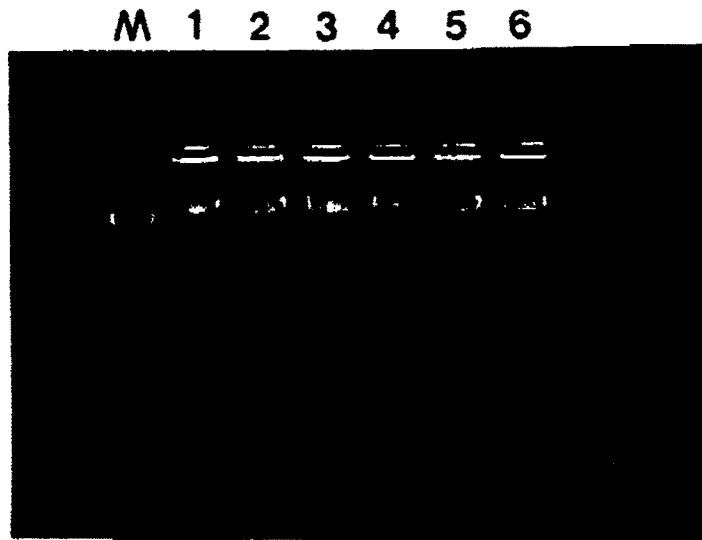


Figure 1. Isolated pig genomic DNA from tissue by phenol extraction methods. Each sample was compared with the Lambda DNA digested with Hind III. 1~6 : pig genomic DNA, M : Lambda DNA/Hind III.

나. 혈액으로부터 DNA 추출

돼지의 경정맥으로부터 혈액 10ml을 채혈한 다음, 3000rpm에서 15분간 원심 분리하여 buffy coat를 모으고 이를 1.5ml tube로 옮기고, 1X SSC로 buffy coat를 부유시킨 다음 3000rpm에서 10분간 원심 분리하여 pellet을 모았다. 이 과정을 2회 반복한 다음 원심 분리하여 모아진 pellet을 Lysis buffer로 재부유시키고, proteinase K(20mg/ml)를 처리하여 65℃에서 6시간 이상 incubation 하였다. 동량의 phenol로 1회, phenol : chloroform (1 : 1)로 2회, 그리고 chloroform : isoamylalcohol (24 : 1)로 1회 추출하고 상층액을 tube에 넣어 24시간 dialysis시켰다 (Sambrook 등, 1989). 추출한 DNA는 최종적으로 50~100ng/ μ l 정도의 농도로 유지하여 보관하였다

다. 정액으로부터의 DNA추출

돼지는 한 마리의 웅돈을 이용하여 15두 내외의 암돼지와 자연 종부시켜 번식하고 있으므로 웅돈이 PSS 인자를 호모 또는 헤테로 상태로 가질 경우, 초래되는 PSS 인자의 전파에 의한 경제적 피해는 크다. 그러므로, 종부에 이용될 웅돈의 정액에 PSS 인자가 존재하는지 하지 않는지 검색하는 것은 중요하다. 따라서 본 연구에서는 웅돈의 정액으로부터 PSS 인자를 탐색하기 위한 기초 작업으로 돼지 정액으로부터 DNA를 분리하였다.

정액의 양을 대략 측정한 다음, 100mM EDTA, 100mM Tris-Cl(pH 8.0)에 suspension 시킨 후 원심분리하는 과정을 3회 실시하여 세척하였다. 동결된 정액은 50%의 glycerol, 5mM EDTA, 10mM Tris-Cl(pH 8.0), 0.5mM spermidine, 0.2mM spermine을 이용하였다. 세척된 정자를 동일한 buffer로 재부유 시킨 후 약 1ml 을 20ml(2% (v/v) 20 mercaptoethanol, 10mM Tris-cl(pH 8.0), 150mM

NaCl, 10mM EDTA, 0.5% SDS) 의 buffer에 섞고 난 후, 50℃ 에서 30분간 배양하여 proteinase K의 작용을 용이하게 하고자 하였다. Proteinase K(20mg/ml)를 최종 농도가 300 μ g/ml 되게 첨가하고 50℃에서 3시간동안 배양하였다. 그리고 난 후 phenol과 chloroform을 이용하여 3-4 추출하고 난 후 알코올 침전과 재부유를 통해 DNA를 얻었다. Figure 2는 돼지의 정액으로부터 추출된 DNA로써 추출과정에서 DNA가 과도하게 절단되거나 파괴되지 않고 대부분 23kb이상의 양호한 크기를 보이고 있다.

M 1 2 3 4 5 6 7 8

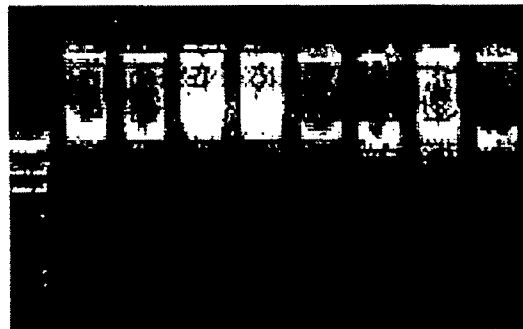


Figure 2. Isolated genomic DNA from frozen sperm by phenol extraction methods. Each sample was compared with the standard Lambda phage DNA digested with Hind III. 1-8: Landrace sperm DNA. M: Lambda DNA digested with Hind III

특히 이러한 DNA는 정액 저장과정시의 문제로 인하여 큰 단편의 DNA를 얻기 어려울 수 있으므로 이후에는 큰 단편의 DNA를 얻기에 매우 편리한 것으로 인정되는 DNAzol(GibcoBRL, Life Technologies, USA) DNA분리 키

트를 이용하는 것이 가능하리라 판단된다.

2. Primer 준비 및 PCR 증폭조건 확립

본 연구에 의해 개발된 PCR primer(EX F, EX R)와 Fujii 등(1991)에 의해 보고된 primer sequence (RYR#1 RYR#2)를 이용하여 PCR을 수행하였다. 각 primer는 Oligo 5.0을 이용하여 DNA 염기서열의 반복되지 않고, primer들간의 상보성을 보이지 않으며, 내부의 특이 구조를 갖지 않고, melting Temperature 에 있어서 1℃이내의 차이를 가지는 부위를 선택하여 이용하였다. 합성된 PCR primer들은 20% polyacrylamide gel에서 전기영동하여 단편의 크기를 측정하여 유효한 크기로 합성되었는지 확인한 다음, UV spectrophotometer를 이용하여 농도를 측정하고 희석하여 PCR 반응에 이용하였다.

각각 479bp와 83bp의 증폭산물을 얻을 수 있었으며 제한효소 처리에 의해 각각 294bp, 185bp와 51, 32bp로 절편화 될 수 있도록 고안되었다. 또한 479bp 크기의 산물은 agarose gel상에서 유전자형 판별을 실시 할 수 있으므로 보다 용이하게 실험을 수행할 수 있을 것으로 예상되었다(Table 1).

Table 1. Oligonucleotide primers used in this study

Primers	Length of PCR products (bp)	Length of restricted fragments (bp)	Sequences	Remarks
RYR #1	83	51, 32	5'-GTT CCC TGT GTG TGT GCA ATG GTG-3' 24mer	Fuji et al., 1991
RYR #2			5'-ATC TCT AGA GCC AGG GAG CAA GTT CTC AGT AAT-3' 33mer	
RYR EX F	479	294, 185	5'-ACC ACC TCT TCT CAG TCA CAT CCC-3' 24 mer	This study
RYR EX R			5'-GAG ACA GAG GGA GAA AGA GTT TG-3' 23 mer	

각각의 primer에 대한 PCR 증폭조건 확립을 위해 PCR반응에 이용되는 template DNA의 양을 조절하였으며 50 μ l 반응액에 50-100ng의 DNA가 적절함을 알 수 있었다. 또한 PCR 증폭반응에 영향을 미치는 요인으로써 MgCl₂ 이온의 농도를 고려하여 PCR을 수행한 결과 1.0mM에서 2.0mM의 농도범위에서 양호한 증폭양상을 보였으나, 1.5mM의 농도로 고정하여 이후 사용하였다. 또한 PCR 증폭양상은 primer의 양이 과다하게 이용되는 경우 양호한 증폭양상을 보이지 않았는데 50 μ l반응시 30pmol을 넘지 않도록 이용하였다. 또한 충분한 양의 PCR 증폭산물을 얻기 위해 40회 이상의 반응회수를 유지하였으며 따라서 two-step PCR을 이용하여 증폭산물을 얻어야 하는 시도는 필요하지 않았다.

Figure 3은 EX F, EX R을 이용한 PCR양상이다. 예상된 대로 479bp 크기의 증폭산물을 보이고 있으며 5개체에서 양호한 증폭산물을 보이고 있다. 각각 40회의 증폭반응을 실시한 것으로 제한효소처리에 의해 유전자형 파악을 위한 충분한 양의 DNA가 증폭된 것으로 판단된다.

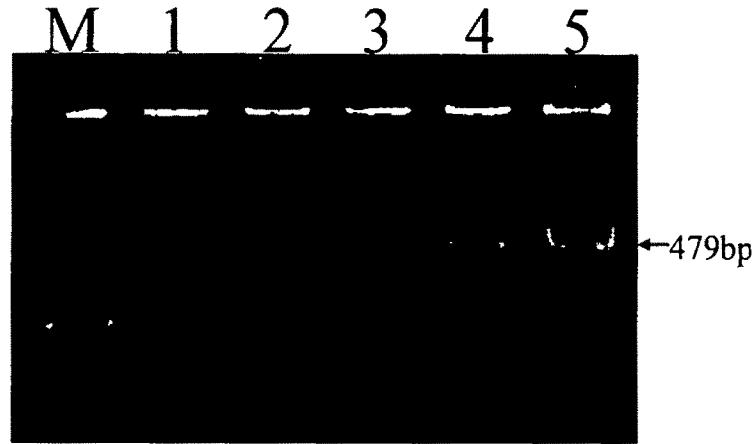


Figure 3. Amplified products of pig ryr 1 locus using primer set EX F and EX R, showing the expected 479bp products. M: molecular size standards, pUC 19 DNA digested with Hae III, 1-5: Landrace pigs.

3. 제한효소 처리 및 전기영동 조건 확립

증폭된 PCR산물을 이용하여 유전자형을 판별하기 위해 제한효소 처리에 의한 단편양상을 관찰하고자 하였다. 돼지의 PSS 돌연변이가 존재하는 부위는 두 가지의 제한효소에 의해 인지되는데 Hha I은 (GCGC)는 정상 개체의 DNA서열을 인지하여 단편화하며, 돌연변이 유전자에 대해서는 염기서열변이에 의해 단편화시키지 못한다. 따라서 이러한 방법을 이용하면 유전자형을 파악할 수 있게된다(Fujii 등, 1991). 또 다른 효소로 Asp H I은 인지서열이 상반되기 때문에 정상개체의 서열에 대해서는 단편화가 불가능하나 돌연변이

서열에 대해서는 단편화되어 유전자형 판별을 가능하게 한다. 이러한 돌연변이 부위 검색기법은 매우 다양한데, 본 연구에서는 가장 손쉽게 접근할 수 있는 제한효소 절편다형을 이용하고자 하였다. 여러 가지 방법 중에서 SSCP(single strand conformation polymorphism, Orita 등, 1993)은 증폭산물의 돌연변이에 의해 전기영동시의 단일가닥내부에 형성되는 입체구조의 차이를 이용하는 방법이다. 이 방법은 제한효소를 이용하지 않는 장점이 있기 때문에 실험기구의 확보와 특정 돌연변이 유전자에 대해 실험적 조건이 확립되면 매우 손쉽게 유전자형을 판별할 수 있는 방법이다. 그러나 본 연구에서는 제한효소를 이용하였으며, 추후 직접 PCR에 의해 손쉽게 관찰할 수 있는 AS-PCR기법을 확립하였다.

Hha I에 의한 절단을 위해 PCR 산물 20 μ l에 reaction buffer (100mM Tris-Cl pH7.5, 100mM MgCl₂, 10mM Dithiothreitol, 500mM NaCl) 3 μ l, Hha I 1 μ l(5units), ddH₂O 6 μ l를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 5시간이상 반응시켜 절단하였다. 절단된 단편 양상의 정확도를 기하기 위해 유전자형을 알고 있는 개체의 PCR증폭산물을 동일조건하에서 절단하여 제한효소 처리과정의 미숙에 의한 유전자형 판별의 오차를 제거하였다.

제한효소로 절단된 단편을 확인하기 위하여 RYR #1, #2에 의해 증폭된 83bp산물에 대해서는 예상단편의 크기가 매우 작으므로 15% polyacrylamide gel에서 전기 영동을 하였다. Polyacrylamide gel은 TBE buffer(90mM Tris-borate, 2mM EDTA pH 8.0)에서 2시간 동안 200v로 전기 영동을 하였다. 전기 영동한 젤은 Ethidium Bromide 용액(0.5 μ g/ml)에서 염색을 시킨 후 UV illuminator에서 밴드 양상을 관찰하였다 (Figure 4).

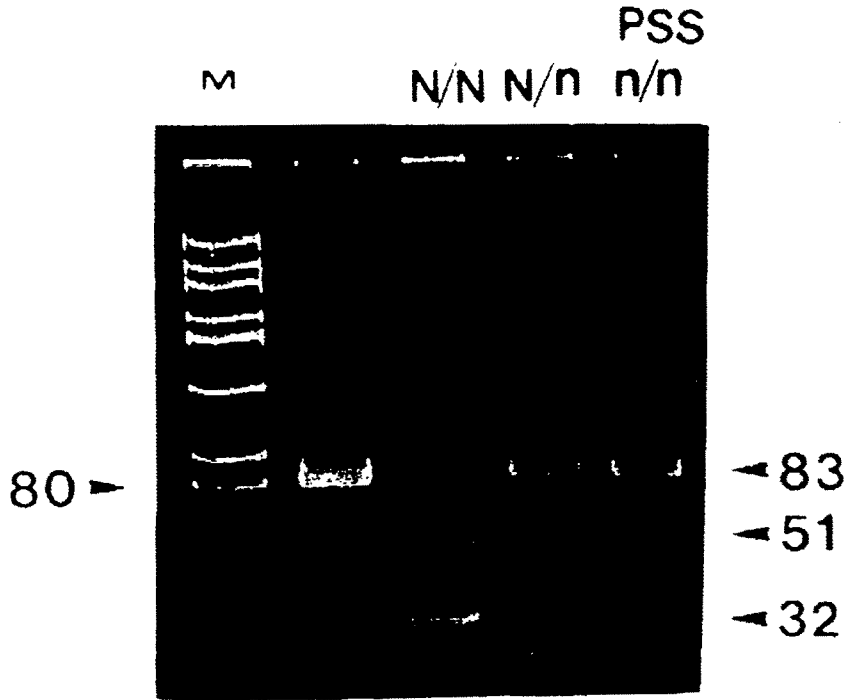


Figure 4. Results of electrophoresis of amplified DNA from normal, heterozygous and PSS individuals following restriction enzyme digestion(N/N : normal individual, N/n : heterozygous, n/n : PSS).

또한 Hha I과 절편양상이 상반되게 나타나는 Asp H I을 이용하여 유전자형을 재확인하여 유전자형의 오차를 제거하였다.

또한 polyacrylamide gel 전기영동과정보다 agarose gel을 이용하는 것이 처리과정이 용이하기 때문에 보다 큰 단편을 증폭하는 EX F와 EX R를 이용한 증폭산물을 이용하여 보다 손쉽게 유전자형을 판별하였다. 제한효소 처리과정은 앞서의 경우와 동일한 과정을 거쳤으며 Figure 5에 유전자형 판

별결과를 제시하였다. 각각 Hha I과 Asp H I에 의해 나타나는 단편양상을 보이고 있으며 동일개체에 대해 상반되는 단편양상을 보이고 있다.

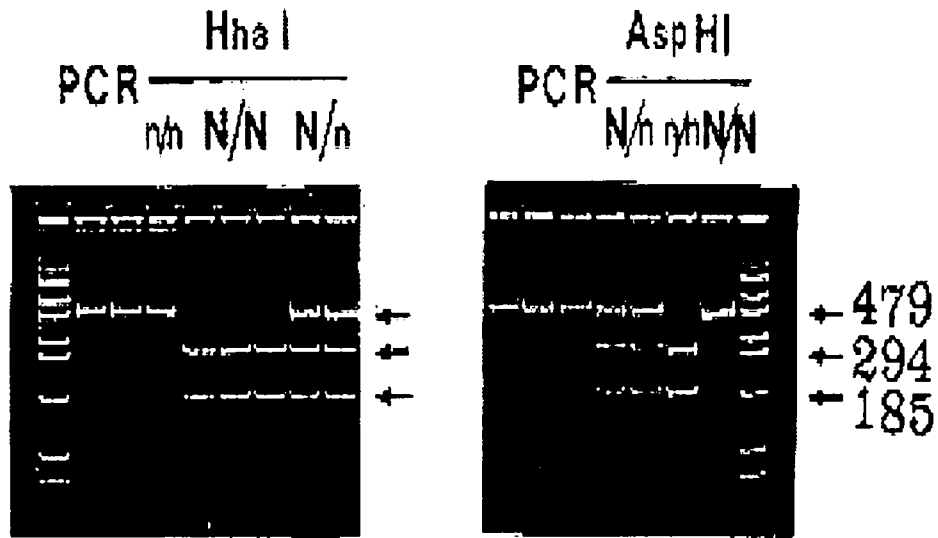


Figure 5. Resultant pattern of restricted PCR products on 2% agarose gel using two different Restriction Enzyme. N/N: normal, N/n: heterozygous carrier, n/n: PSS affected.

제 3 절. 유전자형 판별기술의 효율향상

1. 혈액 직접 PCR 기법 확립

혈액은 생물학적 연구와 진단을 위한 가장 일반적으로 이용되는 재료로써 DNA연구를 위해서도 주로 이용되는 시료이다. 그러나 일반적으로 포유류를 포함한 돼지의 적혈구는 핵을 가지고 있지 않으므로 적은 수의 백혈구만을 이용하여 DNA를 추출하게된다. 그러나 혈액을 이용한 추출방법에는 페놀 등의 유기용매를 이용하는 방법과 단백질 분해효소와 detergent를 이용하여야 하며 실험과정에 많은 노력이 소요된다. 따라서 많은 연구자들은 PCR증폭을 위해 혈액을 직접 이용하고자 하는 노력을 해왔다(Mercier 등, 1990; Burckhardt, 1994).

혈액을 직접 PCR에 이용하기 위해서는 혈액내의 염과 효소저해제나 항응고제도 이용되는 EDTA 등의 농도를 고려하여 적절한 조건을 설정하여야 한다. 따라서 본 연구에서는 혈액을 1000배 이상 희석하여 이를 전처리 과정을 거쳐 이용하였다. 혈액 세포를 미량 이용하면 여러 효소저해제의 효과를 최소화 할 수 있을 뿐 아니라, 염과 항응고제에 의한 효과를 무시할 수 있게 된다. 따라서 본 연구에서는 1-10 μ l의 희석된 혈액을 이용하였으므로 백혈구세포가 4-40개가 포함되었다. 희석된 혈액은 동결, 용해의 과정을 1-2회 실시한 후, 97 $^{\circ}$ C, 3분, 55 $^{\circ}$ C, 3분의 과정을 3회 반복하여 세포파괴를 완료하였다. 준비된 혈액을 이용하여 실시된 PCR산물은 아래 Figure 6과 같았으며 양호한 증폭산물을 보였다. 혈구의 수는 증폭정도에 큰 영향을 미치지 않았으며 따라서 희석에 의한 혈액 직접 PCR이 매우 성공적으로 수행되었으며, 유전자형 판별을 보다 손쉽게 실시할 수 있는 기술을 확보하게 되었다.

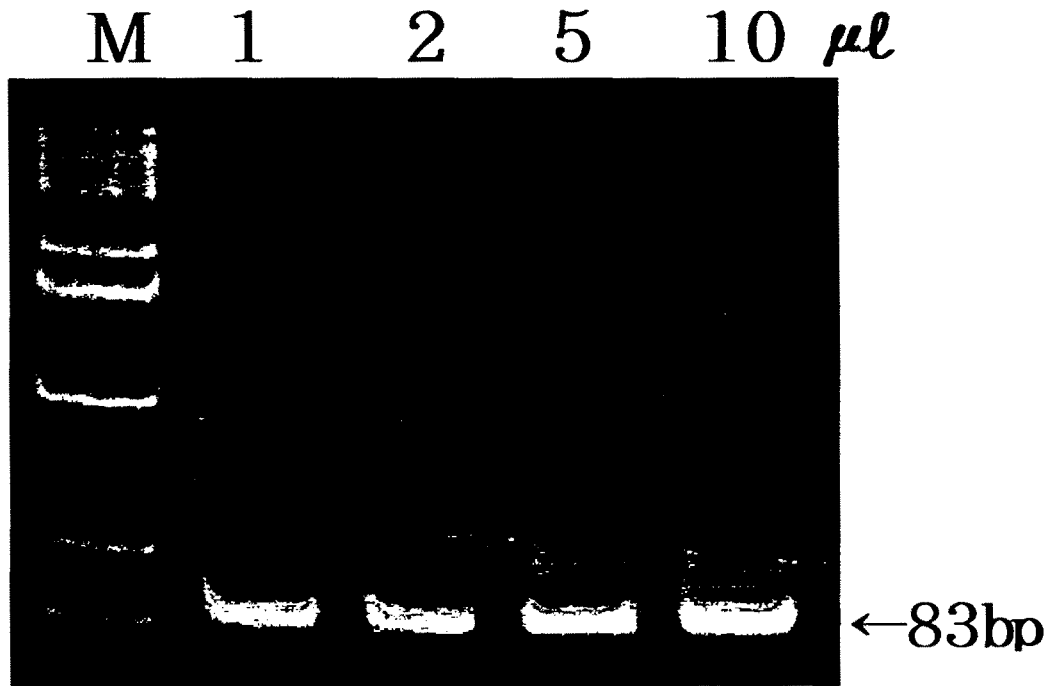


Figure 6. Direct amplification of porcine ryr 1 locus from diluted whole blood. Fresh blood was diluted into 1,000 times of ddH₂O and small volume of it was used in PCR reaction as indicated above. M: pUC 19/Hae III.

2. 모근을 이용한 PCR 기법 확립

모근은 PSS와 같이 다수의 가축을 대상으로 유전자형을 검색하기 위해 매우 유용한 유전자 재료로써 이용될 수 있는데 이에 대한 연구는 여러 차례 보고 되었다(Higuchi 등, 1989; Vigilant 등, 1989). 우선 모근에서의 DNA를 일부 추출하고자 Higuchi(1989)등에 의한 방법을 바탕으로 수행하였다. 10cm정도의 모근을 증류수와 알코올로 각각 2회 세척한 다음 건조시키고 Proteinase K

가 포함된 500ul의 용액에서 단백질을 제거하였다(10mM Tris-Cl, 10mM EDTA, 0.1M NaCl(pH 8.0), 50ug/ml Proteinase K, 0.039M DTT, 2% SDS). 단백질이 분해된 후 동량의 Phenol/chloroform으로 2회 추출한 후 알코올을 이용하여 DNA를 침전시키고 증류수에 재부유시켜 PCR에 이용하였다.

그러나 모근에서의 DNA 추출은 추출되는 양은 미량으로(50ng이하), 이를 이용하여 PCR수행과 제한효소 처리를 통한 진단은 가능할 것으로 판단되었으나 혈액과 정액을 이용하는 경우보다 소량의 DNA만을 얻을 수 있었다. 따라서 모근을 통한 진단방법은 순수분리과정을 거치지 않고 직접 PCR에 이용할 수 있는 방법을 확립하고자 하였다.

모근의 직접 PCR 증폭 방법은 Ohhara등(1994)에 의한 방법을 변경하여 사용하였다. 채취된 모근을 알코올로 2회 세척한 후 100개 내외의 모근을 직접 전자렌지에서 3-10분간 처리하여 모근내의 세포의 파괴를 일으켰다. 처리된 모근은 3 mL의 증류수로 씻어내어 세포파괴시 추출된 DNA를 녹여 내고 이를 5-10ul 이용하여 PCR을 실시하였다.

Figure 7은 모근 세포를 이용하여 PCR을 실시한 결과이다. 모든 시료에서 PCR증폭산물을 발견할 수 있었으며 유전자 진단에 모근을 이용할 수 있음을 확인하였다. 그러나 그 증폭량이 적어 2차 PCR증폭과정을 거쳐 진단에 이용할 수 있을 것으로 판단되었다. 따라서 본 연구 결과 모근을 이용한 직접 PCR기법이 가능함을 제시하였고 추가적인 연구에 의해 안정된 기술로 확립될 수 있을 것으로 사료된다.

M 1 2 3 4 5 M

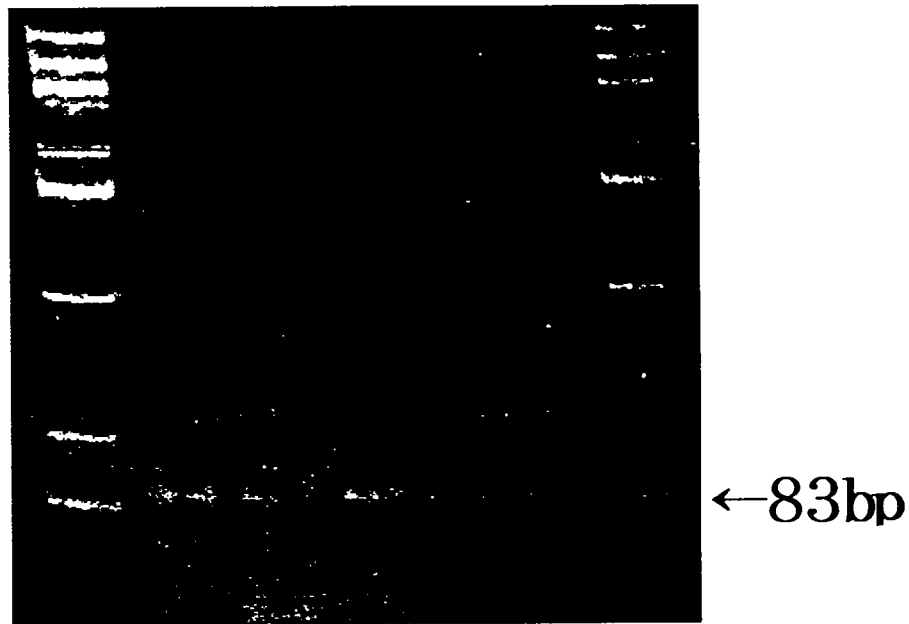


Figure 7. Direct amplification of porcine ryr 1 locus from pretreated hair root cells. M: pUC19/Hae III. Lane 1-6: Microwave-treated hair root cells, each 10 μ l of DNA containing solution was used.

3. AS-PCR기법을 이용한 유전자형 판별 기술 확립

본 실험에서는 보다 신속하고 간편한 검색방법인 AS-PCR(allele specific PCR)기법을 도입하여 검색 가능성을 타진하였다.

사용된 primer sequence는 (1) RYR EX F, 24 mer 5'-ACC ACC TCT TCT CAG TCA CAT CCC-3', (2) RYR EX R, 23 mer 5'-GAG

ACA GAG GGA GAA AGA GTT TG-3', (3) RYR INT F, 22 mer 5'-GTG TGC AAT GGT GTG GCC GCG T-3', (4) RYR INT R, 24 mer 5'-AGT AAT GAG ATC TTG GTT GGA TCG-3'로 내·외 각각 1쌍을 제작하여 이용하였다.

PCR 방법은 총 reaction량이 50 μ l 되도록 PCR 혼합액을 섞은 다음 PCR cycle은 pre-denaturation step으로 97 $^{\circ}$ C에서 5분을 한 후에 denaturation 94 $^{\circ}$ C 1분, annealing 63 $^{\circ}$ C 1분, extension 72 $^{\circ}$ C 1분으로 하여 총 35회를 반복한 후 72 $^{\circ}$ C에서 5분으로 PCR 반응을 종료하였다. 실험 결과 정상, 헤테로, PSS개체에서 모두 공통적으로 479bp 크기의 밴드가 나타났다. 추가적으로 정상개체에서는 208bp, PSS 개체는 316bp 밴드가 보였으며 헤테로 개체에서는 정상 개체와 PSS 개체에서 나타나는 모든 밴드를 보였다 (Figure 8, 9). 따라서 이 AS-PCR 기법을 통해 PCR 증폭만으로도 유전자형 판별이 가능하였고 따라서 제한효소를 처리과정을 생략할 수 있었다.

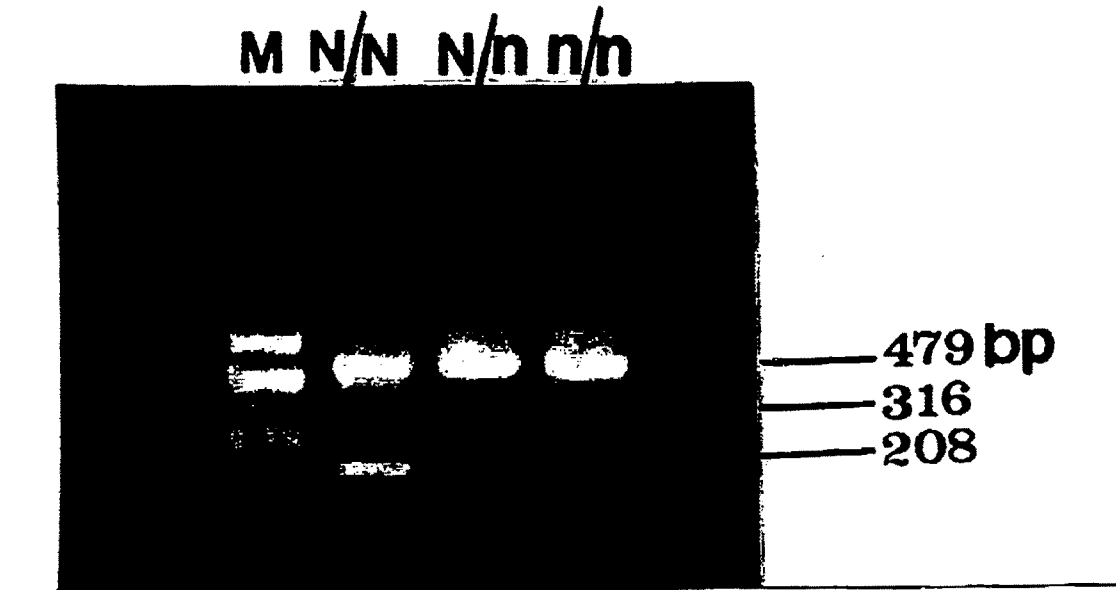


Figure 8. AS-PCR analysis of the +1843 point mutation in *ryr1* gene : PCR samples were loaded onto a 2.0% agarose gel. Lane 1 : DNA standard marker(puc19/Hae III); lane 2 : homozygous pig with genotype N/N ; line 3 heterozygous with N/n ; line 4 homozygous pig with n/n

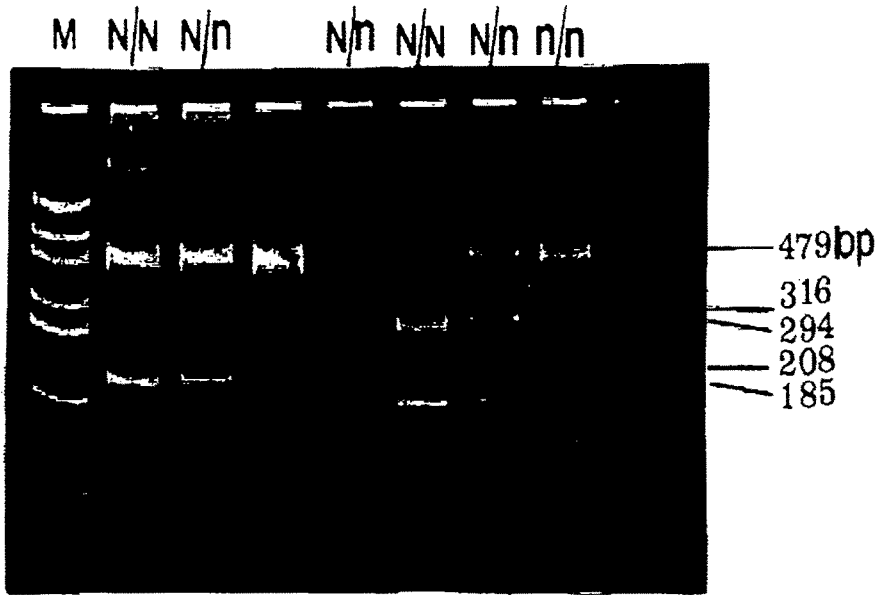


Figure 9. AS-PCR analysis of the 1843 point mutation in *ryr1* gene. PCR samples were loaded onto a 15% polyacrylamide gel. Lane 1 : DNA standard marker(puc19/Hae III); lane 2 : homozygous pig with genotype N/N ; line 3: heterozygous N/n ; line 4: homozygous pig n/n. Lane 5~8 : PCR fragments of Hha I digestion after PCR with primer RYR EX F and RYR EX R , lane 5 : heterozygous with N/n, lane 6 : normal with N/N, lane 7 : heterozygous, lane 8 : PSS with n/n.

제 4 절. 유전자형 파악의 정확도 검증과 유전자형의 유전양상 확인

1. 유전자형 파악 및 정확도 검증

PSS 유전자의 유전연구를 위하여 서울대학교 농업생명과학대학 부속목장에서 PSS 유전자를 hetero 상태로 가지고 있는 개체(피에트레인과 대요크서의 교잡종)끼리의 교배를 통하여 총 27두의 산자를 얻었다. 각각의 산자의 꼬리조직을 채취하여, 이로부터 DNA를 추출하였으며, PCR-RFLP 기법에 의한 PSS 유전자형을 파악하였다. 27두중 8두가 정상으로 나타났으며 14두는 잠재성 개체로, 5두는 PSS 개체로 나타났다.

또한, 조성된 두 가계의 개체 21두를 대상으로 생후 10주령시 halothane 가스 검사를 실시하였다. 검사 결과 양성의 개체는 사지가 경련을 일으키며, 복부가 경직되며, 청자색의 반점이 피부에 나타나는 증상을 보였다. 21두중 19두가 음성으로 나타났으며 2두가 양성으로 나타났다. 양성인 경우는 8두가 정상이었으며 11두가 잠재성 개체로 확인되었다. 예상되었던 바와 마찬가지로 halothane 검사시 양성을 보인 개체는 DNA 검사에서도 열성의 PSS 유전자를 동형접합체 상태로 가지는 것으로 나타나 halothane가스 검사에 의해 양성을 보이는 개체는 돌연변이 열성 유전자형을 가진다는 사실을 확인할 수 있었다. Table 2는 DNA 검사와 halothane검사에 의한 결과를 비교하는 것이다. 따라서 DNA 검사에 의해 확인된 유전자형은 halothane 가스를 이용한 검사에 비해 이형접합체 상태의 개체를 판별하는 장점을 갖는 것으로 본 연구에서도 확인되어 DNA 검사에 의한 PSS 유전자형 파악의 신뢰성을 확인할 수 있었다.

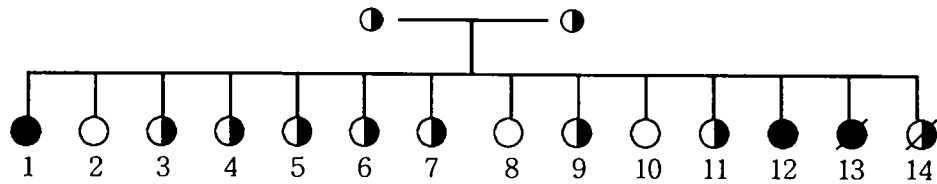
Table 2. Results of the halothane gas test on 21 pigs that were previously determined on the genotypes for the ryr 1 locus by PCR - RFLP assay

Halothane test	ryr 1 genotypes			Total
	Normal (N/N)	Heterozygote (N/n)	Mutant (n/n)	
Normal	8	11	0	19
Affected	0	0	2	2
Total	8	11	2	21

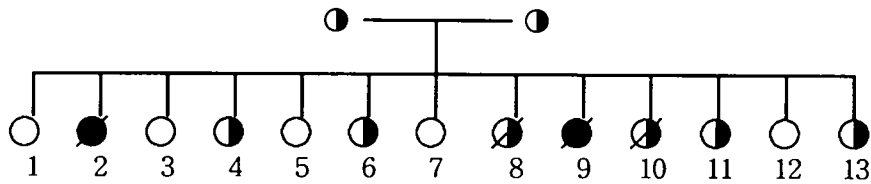
2. PSS 유전자의 유전양상 파악

DNA검사에 의해 확인된 ryr 1 유전자의 돌연변이 양상은 halothane가스 검사에 의한 열성개체의 검색과 마찬가지로 안정적인 유전 전이 양상을 보이는지 확인되어야 한다. 이를 위해 PSS 유전자를 가진 개체를 이용하여 조성된 두 가계를 이용하여 유전자형을 조사하였다. 초기 산자의 꼬리 조직을 이용하여 추출된 DNA를 증폭하였으며 제한효소 처리와 전기영동을 통해 유전자형을 결정하였다. 조성된 가계의 가계도는 figure 10과 같고 결정된 유전자형을 표기하였다. Table 3은 가계내 개체들에 대한 유전자형을 종합한 결과이다.

Family 1



Family 2



○ : Normal ◐ : Carrier ● : PSS ∅ : Dead

Figure 10. Pedigrees showing the segregation pattern of ryr 1 mutant allele in two pig families.

Table 3. Distribution of genotypes of ryr1 locus in the progenies from two families

	Genotypes of ryr 1 locus			Total
	Normal (N/N)	Heterozygote (N/n)	Mutant (n/n)	
Family 1	3	8	3	14
Family 2	5	6	2	13
Total	8	14	5	27

생산된 자돈의 PSS 유전자형별 2주령까지의 생존율이 table 4에 표시되어 있다. 이 표의 자료를 보면 생후 2주령까지의 생존율은 PSS 개체에서 40%로 매우 낮았으며, 잠재성 개체에서 78.6%이었고, 정상개체에서는 100%이었다. Table 4의 자료에 근거하여 생존율에 대한 유전자형간 차이에 대하여 유의성 검정을 실시한 결과 생존율의 유전자형간 차이는 통계적 유의성이 있었다($p < 0.05$). PSS 개체는 환경적으로 스트레스에 매우 민감하게 반응하여 쉽게 폐사되었으며, 잠재성 개체도 정상개체에 비하여 폐사율이 높게 추정되었다.

Table 4. Viability of the pigs to 2 weeks of age by the PSS genotypes

Item	Genotypes		
	Normal(N/N)	Hetero(N/n)	PSS(n/n)
Total no. born	8	14	5
Number dead	0	3	3
Viability(%) ¹	100	78.6	40

¹ : Viability to 2 weeks of age

서울대학교 농업생명과학대학 부속 실험목장에서 잠재성 개체(N/n)와 잠재성 개체간의 교배에 의하여 생산된 자료에 있어 PSS 유전자형별 관측두수(Observed number)와 기대두수(Expected number)가 table 5에 표시되어 있다. 이 표의 분리비에서 PSS 유전자형별 기대두수는 PSS가 보통 염색체상에 있는 열성 유전자(recessive gene)에 의하여 나타나게 된다는 가정하게 계산된 것이다.

Table 5. Observed and expected numbers of pigs by the PSS genotype on the basis of the autosomal recessive inheritance of the PSS gene¹

Item	Genotypes		
	Normal(N/N)	Hetero(N/n)	PSS(n/n)
Observed number	8	14	5
Expected number ²	6.75	13.50	6.75

¹ : χ^2 test showed that the differences between observed and expected numbers are statistically insignificant($p>0.05$)

² : Number expected on the basis of the autosomal recessive inheritance of the PSS gene

PSS 유전자가 보통 염색체(autosome)상에 있으며 열성인 경우 잠재성 개체간의 교배에 의한 후대에서의 분리비는 정상개체 1/4, 잠재성개체 2/4 및 PSS 개체 1/4의 비율이 될 것으로 기대된다. 본 연구에서 조사된 PSS 유전자형별 관측두수와 기대두수에 근거하여 χ^2 검정을 실시한 결과 관측두수와 기대두수간 차이는 통계적 유의성이 없었다. 따라서 본 연구에서의 분리비는 PSS가 보통 염색체상의 열성 유전자에 의하여 나타나게 된다는 데 근거하여 설명될 수 있다.

제 5 절. PSS 유전자형의 빈도

현재까지 종돈장 및 다른 관계기관으로부터 채취한 조직으로부터 PCR-RFLP에 의해 유전자형이 판별된 개체는 총 1,463두(95년 : 175두, 96년 : 695두, 97년 : 593두)로 유전자형 빈도는 정상개체(N/N) 1,183(80.86%)두, 잠재성 개체(N/n) 254(17.36%)두 그리고 PSS 개체(n/n) 26(1.78%)두로 나타났다(Table 6).

Table 6. Genotype distribution of PSS related ryr 1 locus in domestic pig population

	Total	Genotype ^a		
		N/N	N/n	n/n
Pigs	1,463	1,183 (80.86) ^b	254 (17.36)	26 (1.78)

^a : Genotype determined by PCR-RFLP. N/N : normal, N/n : heterozygote, n/n : PSS

^b : Numbers in parentheses are the percentage of pigs.

국내의 돼지육종 프로그램에 PSS 유전자 판별을 활용할 수 있는 모델을 설정하기 위해서는 국내 종돈에 있어 PSS 유전자의 품종별 분포, 농장별 분포 및 지역적 분포를 조사하는 것이 필요하다. 대요크셔종 759두, 랜드레이스종 327두, 햄프셔종 4두, 듀록종 367두 및 버크셔종 6두에 대한 검색결과에 근거하여 추정된 PSS 유전자에 대한 유전자형 빈도와 유전자빈도는 table 7과 같다. 햄프셔종은 조사 두수는 적었지만 모든 개체가 정상으로 나타났다으며, 버크셔종과 듀록종은 heterozygote 빈도가 각각 16.7%, 3.0%로 나타났지만 PSS인 개체는 검색되지 않았다. 대요크셔종에서는 hetero-

zygote 빈도가 16.8%, PSS 1.3%를 보이고 있다. 랜드레이스종의 경우에는 heterozygote 빈도가 34.97%, PSS가 4.9%로 매우 높은 비율로 나타났다. 유전자형빈도에 근거해서 추정된 PSS 유전자의 빈도는 대요크셔종에서 0.098, 랜드레이스종에서 0.224, 듀록종에서 0.015 그리고 버크셔종에서는 0.084로 랜드레이스종에서 높게 추정되었다.

종돈장별로 추정된 PSS 유전자형의 빈도가 table 8에 표시되어 있다. 이 table의 자료를 보면 종돈의 PSS 출현 빈도가 종돈장별로 상당한 차이가 있음을 알 수 있다. 23개 분석대상 종돈장 중 5개 종돈장에서만 PSS 유전자의 빈도가 0으로 추정되었으며 9개 종돈장에서는 종돈의 20 %이상이 PSS 유전자를 homo 또는 hetero 상태로 보유하고 있는 것으로 나타났다.

Table 7. Distribution of genotype determined by PCR-RFLP within breeds

Breeds	Pigs	Genotype ^a			Gene Frequency ^b		Predicted Frequency of Genotype ^c			Frequency in USA ^{**}		
		N/N	N/n	n/n	p	q	p ²	2pq	q ²	Pigs	q	N/n
L. Yorkshire	759	621 (81.8) ^c	128 (16.8)	10 (1.3)	0.902	0.098	81.3	17.6	0.9	1,727	0.10	0.19
Landrace	327	197 (60.2)	114 (34.9)	16 (4.9)	0.776	0.224	60.2	34.7	0.5	1,962	0.19	0.35
Hampshire	4	4 (100)	0 (0)	0 (0.0)	1.000	0.000	100	0.0	0.0	496	0.07	0.14
Duroc	367	356 (97.0)	11 (3.0)	0 (0.0)	0.985	0.015	97.0	2.9	0.0	718	0.08	0.15
Berkshire	6	5 (83.3)	1 (16.7)	0 (0.0)	0.916	0.084	83.9	15.3	0.0	-	-	-
Total	1463	1183 (80.86)	254 (17.36)	26 (1.78)	0.8954	0.1046	80.17	18.74	1.09	4,961	0.14	0.25

^aGenotype determined by PCR-RFLP. N/N : normal, N/n : heterozygote, n/n : PSS

^bp: N frequency, q: n frequency

^cNumbers in parentheses are the percentage of pigs. x² test showed the evidence that the populations were in Hardy-Weinberg equilibrium with respect to predicted frequency.

** O'Brien et al.(1993).

Table 8. Distribution of genotype within 23 farms in Korea

Farms	Pigs	Genotype		
		Normal(N/N)	Hetero(N/n)	PSS(n/n)
1	69	45 (62.2)*	20 (29.0)	4 (5.8)
2	5	4 (80.0)	1 (20.0)	0 (0.0)
3	26	25 (96.2)	1 (3.8)	0 (0.0)
4	6	2 (33.3)	4 (66.7)	0 (0.0)
5	42	27 (64.3)	15 (35.7)	0 (0.0)
6	54	28 (51.9)	21 (38.9)	5 (9.2)
7	60	30 (50.0)	22 (36.7)	8 (13.3)
8	38	35 (92.1)	2 (5.3)	1 (2.6)
9	117	101 (86.3)	16 (13.7)	0 (0.0)
10	12	9 (75.0)	2 (16.7)	1 (8.3)
11	3	3 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
12	16	15 (93.8)	1 (6.2)	0 (0.0)
13	5	4 (80.0)	1 (20.0)	0 (0.0)
14	11	11 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
15	18	12 (66.7)	6 (33.3)	0 (0.0)
16	22	17 (77.3)	5 (22.7)	0 (0.0)
17	19	16 (84.2)	3 (15.8)	0 (0.0)
18	39	34 (87.2)	5 (12.8)	0 (0.0)
19	15	15 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
20	61	52 (85.2)	9 (14.8)	0 (0.0)
21	47	38 (80.9)	8 (17.0)	1 (2.1)
22	8	8 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
23	2	2 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Total	695	533 (76.7)	142 (20.4)	20 (2.9)

* : Numbers in parentheses are the percentage of pigs within farms

지역별로 추정된 PSS 유전자형의 빈도가 table 9에 표시되어 있다. 경기도, 전라도 및 제주도에서는 PSS의 출현빈도가 큰 차이를 보이지 않으나 경상도 지역에서는 Hetero 28.7%, PSS 6.0%로 매우 높은 비율로 추정되었다.

Table 9. Distribution of genotype within 4 provinces in Korea

Breeds	Pigs	Genotype		
		Normal(N/N)	Hetero(N/n)	PSS(n/n)
Kyungsang-do	300	196	86	18
		(65.3)*	(28.7)	(6.0)
Chulla-do	153	132	20	1
		(86.3)	(13.1)	(0.6)
Cheju-do	124	105	19	0
		(84.7)	(15.3)	(0.0)
Kyungki-do	118	100	17	1
		(84.7)	(14.4)	(0.9)
Total	695	553	142	20
		(76.7)	(20.4)	(2.9)

* : Numbers in parentheses are the percentage of pigs within 4 provinces in Korea

제 6 절. PSS 유전자형이 경제형질에 미치는 효과

1. 능력검정과 PSS 유전자형의 효과

PSS의 유전자형이 확인된 종돈 1,463두에 대한 능력검정에서 측정된 검정돈의 30kg 도달일령, 일당증체량, 90kg 도달일령, 사료요구율, 등지방두께, 정육율 및 선발지수를 최소자승법으로 분석하여 얻은 유전자형의 최소자승평균치와 표준오차는 table 10 및 table 11과 같다.

Table 10. Least squares means of the genotypes for the age of at 30kg, average daily gain, age at 90kg and feed efficiency and the standard errors estimated on the basis of the data from the performance tested pigs

Genotype	Age at 30kg(day)	Ave. daily gain(g)	Age at 90kg(day)	Feed efficiency
Normal(N/N)	74.3 ^a ±1.17	876.8 ^a ±15.0	142.7 ^a ±1.8	2.39 ^a ±.027
Hetero(N/n)	75.9 ^{ab} ±1.30	871.8 ^a ±16.3	144.6 ^a ±1.9	2.38 ^a ±.030
PSS (n/n)	78.6 ^b ±2.10	797.9 ^b ±26.2	152.0 ^b ±3.1	2.44 ^a ±.048

^{a,b} : Means in the same column with different superscripts are significantly different (p<0.05).

Table 11. Least squares means of the genotypes for the backfat thickness, lean meat content and selection index and the standard errors estimated on the basis of the data from the performance tested pigs

Genotype	Backfat thickness(cm)	Lean content (%)	Selection index
Normal (N/N)	1.47±.014	56.1±.22	209.8±2.3
Hetero (N/n)	1.45±.015	56.3±.24	210.2±2.6
PSS (n/n)	1.45±.024	56.4±.39	202.2±4.1

종돈에 대한 능력검정은 체중 30kg에서 시작하여 90kg에 도달하였을 때 종료하였으며 전 검정기간중에 조단백질 수준 15.5%인 검정사료를 자유 급식시키었다. 등지방두께는 검정 종료시에 어깨, 등 및 엉덩이의 3개 부위에서 초음파 기구를 이용하여 측정하고 그 평균치를 이용하였다.

유전자형이 판별된 자돈이 능력검정에서 얻은 성적의 통계분석 결과를 보면 검정기간중의 일당증체량과 사료요구율은 PSS유전자를 homo상태로 가지고 있는 PSS개체에서 저항성 개체와 잠재성 개체에 비하여 현저하게 불량하였으며 30kg 도달일령과 90kg 도달일령은 PSS 개체에서 정상개체에 비하여 현저하게 늦은 경향이 있었다. PSS 개체와 정상개체간 차이는 30kg 도달일령, 일당증체량 및 90kg 도달일령에서 통계적 유의성이 있었으며 PSS개체와 잠재성 개체간의 차이는 일당증체량과 90kg 도달일령에서 통계적 유의성이 있었다. Table 11의 자료에서 PSS 개체, 잠재성 개체 및 정상 개체의 평균 등지방두께는 1.45~1.47 cm의 범위내에서 추정되었다. 그러나 등지방두께에 대하여 암수별로 추정된 PSS 유전자형의 최소자승 평균치를 보면 수컷에서는 PSS 개체가 정상개체에 비하여 0.055cm 더 얇았으나 암컷에서는 PSS 개체가 정상개체에 비하여 0.068cm 더 두껍게 추정되었다.

정육율은 PSS 개체에서 56.4cm로 세 가지 유전자형 중 가장 높게 추정되었으나, 유전자형간 정육율의 차이는 통계적 유의성이 없었다. 검정기간중의 일당증체량, 사료요구율 및 등지방 두께의 세 가지 형질에 근거한 선발지수에서는 잠재성 유전자형에서 210.2로 가장 높았으며 PSS 유전자형에서 202.2로 가장 낮게 추정되었다.

PSS 유전자형이 판별된 돼지에 대한 능력검정에서 조사된 자료에 근거하여 정상개체와 PSS 개체간의 차이, $NN - nn$, 와 잠재성 개체와 두 동형 접합체의 평균간 차이, $Nn - (NN + nn)/2$,를 추정한 결과가 table 12에 표시되어 있다. 잠재성 개체와 두 동형접합체의 평균간 차이, $Nn - (NN + nn)/2$

는 우성의 정도(degree of dominance)를 나타내는 하나의 척도라고 볼 수 있다(Falconer, 1989). Table 12의 자료를 보면 $Nn - (NN + nn)/2$ 의 값은 30kg 도달일령, 일당증체량, 90kg 도달일령, 사료요구율, 등지방두께 및 선발지수에서는 $NN - nn$ 의 값과 그 부호가 같았으나 정육율에서 그 부호가 달랐다.

Table 12. The differences between the two homozygotes, $NN - nn$ and between the heterozygote and mean of the two homozygotes, $Nn - (NN + nn)/2$, for the economic traits estimated on the basis of the data from performance tested pigs genotyped

Traits	$NN - nn^a$	$Nn - (NN + nn)/2^b$
Age at 30kg (day)	-4.2	-0.7
Average daily gain(g)	78.9	34.45
Age at 90kg (day)	-9.3	-2.75
Feed efficiency	-0.05	-0.035
Backfat thickness(cm), male	0.055	0.0165
Backfat thickness(cm), female	-0.068	-0.057
Lean meat content(%)	-0.03	0.05
Selection index	7.6	4.2

^a : $NN - nn$ = the difference between NN and nn

^b : $Nn - (NN + nn)/n$ = the difference between the heterozygote and mean of the two homozygotes.

돼지의 생존율에 영향을 미치는 몇 가지 질병과 신체 이상의 유전자형별 발생 빈도를 보면 table 13과 같다. 조사대상돈 695두 중에서 패혈증의 발생률이 PSS 돼지에서 다른 두 유전자형에 비하여 높았으며 전지이상, 후지이상, 위축돈 및 생식기 이상의 발생률은 잠재성 개체에서 정상개체에 비하여 높은 경향이 있었다.

Table 13. Frequency of certain diseases and abnormalities in the PSS genotypes

Disease or abnormality	Genotype		
	PSS (n/n)	Hetero (N/n)	Normal (N/N)
Septicemia	1 (5.0) ^a	0 (0.0)	0 (0.0)
Unsound fore legs	2 (10.0)	26 (18.3)	48 (9.0)
Unsound hind legs	1 (5.0)	8 (5.6)	11 (2.1)
Weakness	0 (0.0)	4 (2.8)	6 (1.1)
Abnormal reproductive organ	0 (0.0)	3 (2.1)	6 (1.1)
Total no. of pigs	20	142	533

^a : Numbers in the parentheses are the percentage of pigs.

2. 통계분석

가. 능력검정 자료의 통계분석

정상, 잠재성 또는 PSS로 판별된 돼지 1,463두에 대한 능력검정에서 측정된 일당증체량, 90kg 도달일령, 사료요구율, 등지방두께, 정육율 및 선발지수는 다음의 선형모형을 이용하여 통계분석을 실시하였다.

$$Y_{ijklm} = \mu + g_i + b_j + s_k + t_l + e_{ijklm}$$

여기서, Y_{ijklm} 은 유전자형이 판별된 돼지의 능력측정치, g_i 는 PSS 유전자형의 효과, b_j 는 품종의 효과, s_k 는 성의 효과, t_l 은 검정종료 년·월의 효과 그리고 e_{ijklm} 는 임의 오차이다.

Table 14에는 PSS 유전자형이 판별된 돼지에 대한 능력 검정에서 측정된 돼지의 PSS 유전자형별, 품종별, 성별 및 연도별 분포가 표시되어 있다.

Table 14. Number of pigs by PSS genotype, breed, sex and year of test that were genotyped and were performance tested

Genotype	No.	Breed	No.	Sex	No.	Year	No.
Normal	1,183	Berkshire	6	Male	1,055	1995	175
Hetero	254	Duroc	367	Female	408	1996	523
PSS	26	Hampshire	4			1997	765
		Landrace	327				
		L. Yorkshire	759				

Table 15에는 능력검정에서 측정된 각 형질에 대한 분산분석결과가 표시되어 있다. 이 분산분석표에서 유의성 검정결과를 보면 PSS에 대한 유전자형간 차이는 일당증체량과 90kg 도달일령에 대하여 통계적 유의성이 있었으나 사료 요구율, 등지방두께, 정육율 및 선발지수에 대하여는 통계적 유의성이 없었다. 30kg 도달일령에 대한 분산분석 및 유의성 검정 결과를 보면 유전자형의 효과, 품종의 효과 및 검정종료 년·월의 효과가 통계적 유의성이 있었다.

Table 15. Analysis of variance of the economic traits for genotype, breed, sex and year-month of test(mean squares)

Source	D.F.	Ave. daily gain	Age at 90kg	Feed efficiency	Backfat thickness	Lean content	Selection index
Genotype	2	75.184**	1.292**	0.0389 ^{NS}	0.0213 ^{NS}	3.662 ^{NS}	735 ^{NS}
Breed	4	95.819**	1.110**	0.1217*	6.9309**	394.616**	3.334**
Sex	1	85.244**	398 ^{NS}	2.9239**	1.8011**	79.893**	17.254**
Year-month	26	335.508**	2.262**	0.4375**	0.0177**	324.173**	5.902**
Error	1,429	11.686	165	0.0386	0.0100	2.560	290

* : p<0.05, ** : p<0.01

PSS 유전자와 경제형질간의 상관관계는 정상, 잠재성 및 PSS 돼지의 능력 검정자료의 통계분석결과에 근거하여 추정하였다. 검정기간중의 일당증체량과 PSS 유전자와의 관계에 있어서는 PSS 개체의 평균 일당증체량은 797.9g으로 세 유전자형 중 가장 낮았으며 잠재성 개체에서는 871.8g, 그리고 정상개체에서는 876.8g으로 가장 높게 추정되었다.

90kg 도달일령에 있어서는 PSS 개체에서 152.0일로 가장 늦었으며 다음은 잠재성 개체의 144.6일 그리고 정상개체에서는 142.7일의 순으로 추정되었다. 사료요구율에 있어서는 PSS 개체에서 2.44로 가장 불량하였고 잠재성 개체와 정상 개체에서는 각각 2.38 및 2.39이었다. 등지방두께는 PSS 개체와 잠재성 개체에서 모두 1.45cm이고, 정상 개체에서는 1.47cm로 추정되어 세 유전자형간 차이가 작은 경향이 있었다. 정육율에 있어서는 PSS 개체에서 56.4%로 세 유전자형 중 가장 높았고 다음은 잠재성 개체의 56.3%와 정상개체의 56.1%의 순이었다. 선발지수는 PSS 개체에서 202.2로 가장 낮았고 정상개체에서는 209.8이었으며 잠재성 개체에서는 210.2로 세 유전자중 가장 높게 추정되었다.

Table 16. Least squares means of the genotypes for backfat thickness estimated for males and for the females with the standard errors(cm)

Genotype	Male	Female
Normal (N/N)	1.427±0.014	1.506±0.015
Hetero (N/n)	1.416±0.015	1.483±0.018
PSS (n/n)	1.372±0.027	1.574±0.038

이상의 통계분석 결과로 미루어 볼 때 PSS 유전자를 Homo 상태로 가지고 있는 PSS 개체는 일당증체량이 현저하게 낮고 90kg도달일령이 늦어지는 등 경제적 손실을 초래하므로 효과적인 육종 프로그램을 통하여 PSS 유전자를 제거하는 것이 필요한 것으로 추론된다.

능력검정성적의 통계분석을 위한 선형모형에 유전자형의 효과, 품종의 효과, 성의 효과 및 검정 종료 년·월의 효과 외에 유전자형과 성간 상호작용의 효과를 추가하여 통계분석을 실시한 결과 PSS 유전자형과 성간의 상호작용의 효과는 등지방 두께를 제외한 다른 모든 형질에서 통계적 유의성이 없었다. 그러나 등지방두께에 대하여는 PSS 유전자형과 성간의 상호작용 효과가 통계적 유의성이 있었으므로 성별로 PSS 유전자형의 효과를 추정하였다. Table 16에는 등지방 두께에 대하여 성별로 추정된 PSS 유전자형별 최소자승평균치와 표준오차가 표시되어 있다. 이 표의 자료를 보면 수컷에 있어서는 PSS 개체의 등지방 두께가 정상개체나 잠재성 개체에 비하여 얇았으나 암컷에 있어서는 PSS 개체의 등지방 두께가 정상개체나 잠재성 개체에 비하여 두껍게 추정되었다.

각종 경제형질에 대한 품종의 최소자승 평균치와 표준오차는 table 17과 같다. 이 표의 통계분석 결과를 보면 일당증체량은 Duroc종에서 909.1g으

로 5개 품종 중에서 가장 높게 추정되었으며 Hampshire종에서 777.4g으로 가장 낮게 추정되었다. 90kg 도달일령은 Berkshire종, Duroc종 및 Landrace종에서 약 143일로 비교적 빠르게 추정되었으며 Hampshire종에서 156.7일로 가장 늦게 추정되었다. 사료요구율은 Large Yorkshire종과 Duroc종에서 2.37로 다른 품종에 비하여 우수하였다.

등지방 두께는 Landrace종에서 1.26cm로 가장 얇게 추정되었으며 Duroc종에서 1.64cm로 가장 두껍게 추정되었다. 정육율은 Landrace종에서 57.6% 그리고 Large Yorkshire종에서 57.4%로 다른 품종에 비하여 높게 추정되었고 Duroc종에서 55.0%로 가장 낮게 추정되었다. 선발지수는 Landrace종에서 평균 215.9로 가장 높게 추정되었고 Hampshire종에서 196.4로 비교적 낮게 추정되었다.

Table 17. Least squares means of the breeds for the economic traits of pigs performance tested and the standard errors

Breed	Ave. daily gain (g)	Age at 90kg (day)	Feed efficiency	Backfat thickness (cm)	Lean content (%)	Selection index
Berkshire	807.2 ±46.0	142.6 ±5.5	2.42 ±.084	1.53 ±.042	56.0 ±.68	200.6 ±7.2
Duroc	909.1 ±10.4	142.9 ±1.2	2.37 ±.019	1.64 ±.010	55.0 ±.15	208.7 ±1.6
Hampshire	777.4 ±55.2	156.7 ±6.6	2.45 ±.100	1.53 ±.051	55.4 ±.82	196.4 ±8.7
Landrace	877.5 ±9.2	143.5 ±1.1	2.42 ±.017	1.26 ±.008	57.6 ±.14	215.9 ±1.4
L. Yorkshire	873.2 ±8.9	146.5 ±1.1	2.37 ±.016	1.33 ±.008	57.4 ±.13	215.4 ±1.4

나. 실험목장 자료의 통계분석

서울대학교 농업생명과학대학 부속 실험목장에서 분만된 자돈에 대한 능력검정에서는 생시체중, 21일령 체중, 70일령 체중, 등지방두께, 90kg 도달일령, 110kg 도달일령, 이유후 90kg까지의 일당증체량, 110kg까지의 일당증체량, 체중 90kg 및 110kg시의 체고, 체장, 흉폭, 흉위 등의 형질을 개체별로 측정하였다. 실험목장의 능력검정에 공시된 돼지의 두수는 정상 개체 6두, 잠재성 개체 13두 및 PSS 개체 2두로서 총 21두였다. 실험목장의 능력검정에서 조사된 자료는 최소자승법으로 통계분석을 실시하여 각 형질에 미치는 유전자형의 효과를 추정하였다.

생시체중, 21일령 체중, 70일령 체중 및 등지방두께에 대한 PSS 유전자형별 최소자승평균치와 표준오차가 table 12에 표시되어 있다. 이 표에서 PSS 유전자형별 최소자승평균치는 생시체중에서 1.248~1.320kg, 21일령 체중은 4.637~4.869kg 그리고 70일령 체중은 22.97~24.17kg의 범위 내에 있었으나 PSS 유전자형간 이들 형질의 차이는 통계적 유의성이 없었다. 등지방두께의 평균치는 정상 개체에서 1.22cm로서 정상 개체에서 PSS 개체 및 잠재성 개체에 비하여 두꺼운 경향이 있었으나 등지방두께의 유전자형간 차이도 통계적 유의성이 없었다. Table 18의 등지방두께는 검정돈의 체중이 90kg에 도달하였을 때 어깨, 등, 및 엉덩이의 3개 부위에서 초음파 기구를 이용하여 측정하고 그 평균치를 이용하였다.

Table 18. Least squares means of the genotypes for the body weight at birth 21 days and 70 days of age and backfat thickness in the experimental herd and the standard errors

Genotype	Birth weight (kg)	Body wt at 21 days (kg)	Body wt at 70 days (kg)	Backfat thickness ¹ (cm)
Normal (N/N)	1.314 ±0.064	4.868 ±0.214	24.17 ±1.30	1.22 ±0.053
Hetero (N/n)	1.248 ±0.052	4.637 ±0.176	22.97 ±1.06	1.03 ±0.049
PSS (n/n)	1.320 ±0.126	4.849 ±0.424	23.24 ±2.57	0.99 ±0.098

¹ : Backfat thickness was measured at the body weight of 90kg

90kg 도달일령, 110kg 도달일령, 이유후 90kg까지의 일당증체량 및 이유후 110kg까지의 일당증체량에 대한 PSS 유전자형의 최소자승평균치가 table 19에 표시되어 있다. 이 표의 자료를 보면 PSS 개체는 정상 개체에 비하여 90kg 도달일령과 110kg 도달일령이 늦고, 90kg 및 110kg까지의 일당증체량이 낮은 경향이 있었으나 이들 네 형질에 대한 유전자형간 차이는 통계적 유의성이 없었다.

Table 19. Least squares means of the genotypes for the growth rate in the experimental herd and the standard errors

Genotype	Age at 90 kg (day)	Age at 110 kg (day)	Ave. daily gain to 90kg(g)	Ave. daily gain to 110kg(g)
Normal (N/N)	159.5 ±5.1	191.9 ±8.9	738.7 ±39	721.3 ±56
Hetero (N/n)	164.9 ±4.8	190.2 ±8.5	698.3 ±37	709.5 ±53
PSS (n/n)	172.5 ±9.4	200.3 ±16.5	647.5 ±72	695.2 ±103

검정돈의 체중이 90kg에 도달되었을 때 개체별로 측정된 체고, 체장, 흉폭 및 흉위에 대한 PSS유전자형별 최소자승 평균치와 표준오차가 table 20에 표시되어 있다. 이 표의 자료를 보면 체중 90kg시에 측정된 체고, 체장, 흉폭 및 흉위에 대한 PSS 개체의 최소자승 평균치는 정상개체 및 잠재성 개체에 비하여 작은 경향이 있었으나 이들 형질에 대한 유전자형간 차이는 통계적 유의성이 없었다.

Table 20. Least squares means of the genotypes for the body measurements at 90kg in the experimental herd and the standard errors(cm)

Genotype	Body height	Body length	Chest width	Chest girth
Normal (N/N)	60.7 ±0.90	107.5 ±1.51	29.2 ±0.94	98.5 ±1.07
Hetero (N/n)	59.3 ±0.58	104.9 ±0.98	29.4 ±0.61	96.3 ±0.69
PSS (n/n)	57.3 ±1.29	103.8 ±2.17	28.9 ±1.35	95.9 ±1.53

· 검정돈의 체중이 110kg에 도달되었을 때 측정된 체고, 체장, 흉폭, 흉위에 대한 PSS 유전자형별 최소자승 평균치와 표준오차가 table 21에 표시되어 있다. 이 표의 자료를 보면 체중 110kg 에서 측정된 체고, 체장, 흉폭 및 흉위에 대한 PSS 개체의 최소자승 평균치는 정상개체에 비하여 작은 경향이 있었다. 그러나 이들 형질에 대한 유전자형간 차이는 통계적 유의성이 없었다.

Table 21. Least squares means of genotypes for the body measurements at 110kg in the experimental herd and the standard errors(cm)

Genotype	Body height	Body length	Chest width	Chest girth
Normal (N/N)	62.8 ±0.97	116.4 ±2.12	30.8 ±0.63	104.5 ±1.22
Hetero (N/n)	62.0 ±0.64	115.9 ±1.40	30.3 ±0.42	103.3 ±0.80
PSS (n/n)	59.4 ±1.40	115.1 ±3.07	29.9 ±0.91	98.8 ±1.76

제 7 절. 종돈육종에 있어 PSS 유전자의 응용

1. 종돈 개량 측면에서의 PSS 유전자

본 연구에서 PSS 유전자를 homo 상태로 가진 nn유전자형의 개체는 폐사율이 높고 성장률이 낮으며, 사료효율이 불량하고 선발지수는 202.2로 정상개체(N/N)나 잠재성 개체(N/n)에 비하여 현저히 낮게 추정되었다. 따라서 우리나라 종돈을 유전적으로 개량하고, 돼지의 생산성을 높이기 위해서는 국내 각 종돈장의 중핵돈군(nucleus herd)과 원종돈 계통을 대상으로 본 연구에서 개발된 PCR-RFLP 기법을 이용하여 종돈의 PSS 유전자형을 판별한 다음 PSS 유전자를 homo 상태로 가진 개체와 hetero 상태로 가진 개체는 순종 번식에 이용하지

않음으로서, 증핵돈군과 원종돈 계통에서 PSS 유전자를 제거하는 것이 필요하다.

유전자형이 확인된 돼지에 대한 본 연구의 능력검정 결과를 보면 잠재성 개체(N/n)의 평균 선발지수가 210.2로 PSS 개체(n/n)나 정상개체(N/N)에 비하여 높은 경향이 있었다. 또한 잠재성 개체의 정육율은 정상개체에 비하여 약간 높게 추정되었다. 만약 잠재성 개체의 능력이 다른 두 유전자형에 비하여 현저하게 우수한 경우 정상 유전자의 유전자 빈도가 1.0인 NN 계통과 PSS 유전자의 유전자 빈도가 1.0인 nn 계통을 육성한 다음 이들 두 계통을 교배하면 유전자형이 모두 Nn인 일대잡종을 생산하여 비육돈으로 이용하는 방법을 고려해 볼 수 있다. 이러한 교배법을 이용하여 유전자형이 Nn인 비육돈을 생산하려면 능력이 불량한 nn계통을 부모세대에서 이용해야 한다. nn계통을 부모세대에서 이용하는데 기인되는 경제적 손실을 감소하기 위한 방법으로는 Nn 개체를 NN계통에 교배하여 생산되는 후대를 비육돈으로 이용하는 방법이 있다. 이 방법을 이용하는 경우 생산되는 후대는 대략 Nn개체 50%와 NN 개체 50%정도로 이루어 질 것으로 예상된다. 이와 같이 NN계통에 Nn개체를 교배하여 비육돈을 생산하는 방법은 능력이 불량한 nn계통을 조부모 세대에서 이용하게 되므로 nn계통을 부모세대에서 이용하는 방법에 비하여 PSS 계통의 유지에 의한 경제적 손실을 적게 하는 데는 도움이 되지만 생산되는 비육돈에서의 제일성(uniformity)이 떨어지게 된다.

PSS 유전자를 hetero 상태로 가진 잠재성 개체(N/n)에서는 PSS 개체에서와 같이 정상 개체(N/N)에 비하여 PSE 돈육의 발생률이 높을 가능성이 있으며 잠재성 개체에서 PSE 돈육의 발생률이 높게 되면 잠재성 개체를 비육돈으로 이용하는 방법의 중요한 결점이 될 수 있다. 또한 본 연구에서 선발지수와 정육율에 있어 정상개체와 잠재성 개체간 차이는 통계적 유의성이 없었으며 잠재성 개체의 성장률은 정상개체에 비하여 낮은 경향이 있었다. 따라서 본 연구의 결과와 지금까지 실시된 다른 연구의 결과를 종합하여 볼 때 PSS 유전자를 homo 상태로 가진 nn계통을 육성한 다음 NN계통 또는 Nn개체와의 교배를 통해서 유전자

형이 Nn인 후대를 생산하여 비육돈으로 이용하는 방법은 현재의 우리나라 여건 하에서는 실용가치가 낮은 것으로 추론된다.

2. PSS 유전자에 의한 피해를 예방하기 위한 방법

돼지 집단내에 PSS 유전자가 높은 빈도로 존재하는 경우 PSS 개체와 잠재성 개체가 생산되는데 PSS 개체를 사육하면 생존율이 저하되고 PSE 돈육의 발생률이 높아지는 등 PSS 유전자에 의한 피해가 나타나게 되므로 이러한 피해를 예방하는 것이 필요하다.

PSS 유전자에 의한 피해를 예방하는데 가장 효과적인 방법은 본 연구에서 개발된 PCR-RFLP 기법을 이용하여 중핵돈군과 원종돈 계통내 각 개체의 PSS 유전자형을 판별한 다음 PSS 개체와 잠재성 개체를 순종 번식에 이용하지 않음으로서 PSS 유전자의 빈도가 0인 중핵돈군과 원종돈 계통을 형성하고, 이러한 중핵돈군과 원종돈 계통을 이용해서 조부모돈, 부모돈 및 비육돈을 생산하는 것이다.

PCR-RFLP 기법에 의한 PSS 유전자형의 판별이 불가능한 경우 halothane 검정법을 이용하여 PSS 개체를 판별하는 방법을 이용할 수도 있다. Halothane 검정법을 이용하여 PSS 개체만을 식별하는 경우 확인된 PSS 개체뿐만 아니라 이 개체의 형제, 자매 등 혈연관계가 가까운 개체도 순종번식에 이용하지 않으면 돈군내에서 PSS 유전자를 보다 효과적으로 제거하는데 도움이 된다.

돈군내에서 PSS 개체가 생산되는 경우 적절한 관리를 통해서 PSS 유전자에 의한 피해를 줄이는 것이 가능하다. PSS 돼지에서의 피해를 줄이기 위한 관리요령은 다음과 같다. 첫째, 비육돈을 시장에 출하하기 위하여 트럭에 실을 때 다른 돈방에서 사육된 돼지와 같이 수용하지 않아야 한다. 만약 다른 돈방에서 사육된 돼지를 한 트럭에 실는 것이 필요한 경우에는 트럭 내에 칸막이를 하여 다른 돈방에서 사육된 개체와 섞이지 않게 한다. 둘째, 비육돈은 출하하기 전제 1

2~14시간 절식시키는 것이 바람직하다. 셋째, 비육돈의 출하는 비오는 날 보다는 맑게 개인 날에 실시하는 것이 좋다. 넷째, 여름철에는 무더운 날 보다는 서늘한 날에 출하하며 하루 중에도 기온이 서늘한 시기에 출하하는 것이 좋다. 다섯째, PSS 돼지는 이유후 다른 돈방에 수용할 때 가능하면 동복자돈으로 군을 편성하면 PSS에 의한 피해를 예방하는데 도움이 된다.

따라서 유전자형이 nn으로 되어 있어 PSS에 대하여 감수성인 개체라도 적절한 관리를 하는 경우 폐사하지 않고, 오랜 기간 사육할 수도 있다. 본 연구를 위하여 서울대학교 농업생명과학대학 부속 실험목장에서 분만된 PSS 돼지 5두 중 3두는 생후 2주령에 도달되기 전에 폐사하였으나 나머지 2두인 1-1호와 1-12호는 적어도 생후 515일령까지 사육할 수 있었다.

제 8 절 . 결 론

PSS 유발하는 ryanodine receptor상의 단일 염기 돌연변이에 대한 PCR-RFLP 기법이 보고되기 전에는 주로 할로텐 가스 마취에 의한 사지 및 근육 강직 정도로 PSS 유전자 보유 여부를 조사하여 왔으나 검색 개체에 대해 해를 끼치거나 실험 수행자에 따른 오차, 잠재성 개체에 대한 정확한 진단의 어려움 등의 많은 문제점이 존재하였다. 본 실험 결과 이표 작업시 발생되는 적은 양의 조직만으로도 PSS 유전자 탐색이 가능함을 알 수 있으며, direct PCR의 조건이 확립될 경우에는 적은 양의 혈액으로도 빠른 시간내에 PSS 유전자의 판별이 가능하게 될 것이다. 따라서 PSS 유전자 판별을 위한 RFLP-PCR 기법의 이용은 종돈내의 PSS 유전자를 효과적으로 제거할 수 있는 방법이라 할 수 있다. 최근에 PCR-RFLP 기법에 의한 DNA 검색 기술은 정확하고 신속하며 잠재성 개체의 구분도 가능하다는 이점이 있기 때문에 이러한 기법을 이용한 집단내 증식돈을 생산할 수 있는 핵군에 대하여

PSS 유전자를 검색할 경우 1~2세대만에 집단내에서 이러한 불량형질을 완전하게 제거할 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 이러한 DNA 검색 기술에 의한 PSS 유전자의 검색 방법은 분자생물학적 기술과 제반 기기가 필요하기 때문에 대규모 종돈장의 경우에도 쉽게 접근할 수 없는 현실을 감안할 때 종돈 산업의 경쟁력 제고 측면에서 대학이나 국가연구기관 등과의 산·학·연 협동이 보다 적극적으로 수행되어 종돈의 생산 및 현장의 애로를 효율적으로 해결하는 것이 바람직하다고 생각된다.

제 9 절 . 참고문헌

- Aalhus, J.L., S. D. M. Jones, A. K. W. Robertson, Tong, A. P. Sather, 1991. Growth characteristics and carcass composition of pigs with known genotypes for stress susceptibility over a weight range of 70 to 120kg. *Animal Production* 52:347-353.
- Burckhardt, J. 1994. Amplification of DNA from whole blood. 1994. *PCR methods Appl* 3:239-243.
- Falconer, D. S. 1989. *Introduction to quantitative genetics*. 3rd edition. Longman Scientific and Technical
- Fujii, J., K. Otsu, F. Zorzato, S. de Leon, V. K. Khanna, J. E. Weiler, P. J. O'Brien, d. H. MacLennan. 1991. Identification of a mutation in porcine yanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science* 253:448

- Higuchi, R., C. H. von Breroldingen. 1988. DNA typing from single hairs. *Nature* 332:543-546.
- Jones, E.W., T. E. Nelson, I. L. Anderson, D. D. Kerr and T. K. Burnap. 1972. Malignant hyperthermia of swine. *Anesthesiology* 36: 42
- Mercier, B., C. Gaucher, O. Feugeas, C. Mazurier. 1990. Direct PCR from whole blood, without DNA extraction. *Nucleic Acids Res.* 18:5908.
- O'Brien., P. J., H. Shen, C. R. Cory, X. Zhang. 1993. Use of a DNA-based test for the mutation associated with porcine stress syndrome(malignant hyperthermia) in 10,000 breeding swine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 203:842-851.
- Ohhara, M., Y. Kurosu, M. Esumi. 1994. Direct PCR of whole blood and hair shafts by microwave treatment. *BioTechniques* 17:726-727
- Orita, M., H. Iwahana, H. Kanazawa, K. Hayashi and T. Sekiya. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphism. *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.* 86:2766-2770.
- Pommier, S. A. and A. Houde. 1993. Effect of the genotype for

malignant hyperthermia as determined by a restriction endonuclease assay on the quality characteristics of commercial pork loins. *J. Anim. Sci.* 1993. 71:420-425.

Rempel, W. E. M. Lu, S. E. Kandelgy, C. F. H. Kennedy, L. R. Irvin, J. R. Mickelson, C. F. Louis. 1993. Relative accuracy of the halothane challenge test and a molecular genetic test in detecting the gene for porcine stress syndrome. *J. Anim. Sci.* 71:1395-1399.

Sambrook, J., E. F. Fritsh and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning :A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Vigilant, L., R. Pennington, H. Harpending, T. D. Kocher, A. C. Wilson. 1989. Mitochondrial DNA sequences in single hairs from a southern African population. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9350-9354.

Webb, A. J. and S. P. Simpson. 1986. Performance of british Landrace pigs selected for high and low incidence of halothane sensitivity. *Anim. Prod.* 43:493-503.

Webb., A. J. A. E. Carden, C. Smith, P. Imlah. 1982. Porcine stress syndrome in pig breeding. *Proceedings of 2nd World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Madrid, Vol. 5, pp 588-608.*

제 4 장. 기대되는 성과 및 활용성

제 1 절. 기대되는 성과

1. 스트레스 감수성 돼지를 조기에 신속 정확하게 확인하여 검색함으로 (100% 정확도) 열성 유전자를 갖지 않는 종돈 생산 기술을 확립하고 이미 열성유전자를 homo 상태나 hetero 상태로 가진 개체를 번식에 이용하지 않음으로서 비육돈 생산시 스트레스 감수성에 의한 피해를 극소화 시킬 수 있다. 유전자 검색 기술 개발에 의한 우수한 능력을 가진 가축(돼지)을 조기에 판별할 수 있는 관련 연구 기반을 구축할 수 있다.

2. 자돈 생산비 감소, 비육돈 폐사율 감소, 열등육 생산을 감소 등의 효과로 양돈농가에서 PSS인자에 의한 경제손실 극소화와 고품질의 돈육생산에 따른 경쟁력 확보를 꾀할 수 있다. 또한 종돈장에서 이들 불량 유전자를 제거함으로써 농가에서는 유전적으로 안정된 비육돈을 생산하여 일본 시장에 지속적인 돼지고기의 수출(불량육 반품율을 극소화시킴 → 신뢰성 있는 교역조건 구축)을 꾀할 수 있다.

3. 전 세계적으로 고급육 생산을 위한 돼지 육종기술 개발과 생산성 손실을 주는 유전적 요인을 제거시키는 첨단기술을 국내에서 개발 보급하게 됨에 따라 국내 돼지 개량기술을 고도화시키고 돼지 사육농가에서 본 연구개발기술의 실용화로 생산성을 높일 수 있는 중요한 전기가 될 것이며 돼지의 육량, 육질에 관여하는 유전자와 이 유전자를 표지하는 표지인자를 탐색하는 연구기술기반 및 이들 관련기술을 실용화시키는 촉매역할을 할 것이다.

제 2 절. 활용 및 건의

PCR-RFLP 기법에 의한 DNA 검색 기술은 정확하고 신속하며 잠재성 개체의 구분도 가능하다는 이점이 있기 때문에 이러한 기법을 이용하여 집단 내 증식돈을 생산할 수 있는 핵돈군에 대하여 PSS 유전자를 검색할 경우 1~2세대만에 집단내에서 이러한 불량형질을 완전하게 제거할 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 이러한 DNA 검색 기술에 의한 PSS 유전자의 검색 방법은 분자생물학적 기술과 제반 기기가 필요하기 때문에 대규모 종돈장의 경우에도 쉽게 접근할 수 없는 현실을 감안할 때 종돈 산업의 경쟁력 제고 측면에서 대학이나 국가연구기관 등과의 산·학·연 협동이 보다 적극적으로 수행되어 종돈 및 비육돈을 생산할 때 현장의 애로를 효율적으로 해결하는 것이 바람직하다고 생각된다.

따라서 종돈 능력 검정소에서 검정하는 종돈에 대해 일차적으로 PSS 인자 보유 여부를 검색하여 PSS 유전자를 homo 상태로 가진 돼지가 농가에 보급되는 경로를 차단하고, 국내 종돈장과 연계하여 PSS 인자 보유 종돈을 검색하고 육종 프로그램에 이용하여 농가에 PSS 인자 보유 돼지를 더 이상 보급되지 않도록 체계화한다. 개발 후에는 국내 축산 관련 연구기관과 연계하여 본 기술의 간편화 및 실용화를 확립하는 것이 중요할 것으로 사료된다.